

Aus dem Zentrum für Humangenetik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik

Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen

Leiterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Mutationsanalysen in *BBS1* und *BBS10* bei Patienten
mit dem Bardet-Biedl-Syndrom**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Helene Luise Claus

aus Ulm

Marburg, 2008

Aus dem Zentrum für Humangenetik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik

Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen

Leiterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Mutationsanalysen in *BBS1* und *BBS10* bei Patienten
mit dem Bardet-Biedl-Syndrom**



Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Helene Luise Claus

aus Ulm

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 09.10.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referentin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

Korreferent: Prof. Dr. med. Jörg Beyer

Kapitel		Seite
1	Einleitung	1
1.1	Das Bardet-Biedl-Syndrom	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Diagnosestellung	3
1.3.1	Differenzialdiagnosen	4
1.3.1.1	Laurence-Moon-Syndrom (LMS)	4
1.3.1.2	McKusick-Kaufman Syndrom (MKKS)	4
1.4	BBS-Gene	5
1.5	BBS, eine Erkrankung der Zilien	6
1.5.1	Klinisch-pathologische Bedeutungen von Defekten im Zilienapparat	9
1.6	Vererbung	10
1.7	Fragestellung in der vorliegenden Studie	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte und Zubehör	13
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Medien und Standardlösungen	13
2.2	Detaillierte Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien	14
2.2.1	Materialien für die DNA-Extraktion	14
2.2.2	PCR-Reagenzien	14
2.2.3	DNA-Längenstandards	14
2.2.4	Ladepuffer	14
2.2.5	Materialien für die Agarosegele	14
2.2.6	Lösungen für die Polyacrylamidgele	15
2.2.7	Lösung für die Gelelektrophorese	15
2.2.8	Chemikalien für Silberfärbung	15
2.2.9	Fertigsysteme (Kits) zur Sequenzierung	15
2.3	Oligonukleotide	16
2.3.1	Oligonukleotide für <i>BBS1</i>	16
2.3.2	Oligonukleotide für <i>BBS10</i>	18
2.4	Software und Datenbanken	19
2.4.1	Software	19
2.4.2	Versuchsplanung und Ergebnisverwaltung	19
2.4.3	Referenzsequenzen	19
2.4.4	Nomenklatur von Sequenzveränderungen	20

Kapitel		Seite
2.5	Experimentelle Methoden für die molekulargenetischen Analysen in <i>BBS1</i> und <i>BBS10</i>	20
2.5.1	DNA-Präparation aus Blutleukozyten	20
2.5.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	20
2.5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.5.3.1	PCR-Optimierung	21
2.5.4	Gelelektrophorese	21
2.5.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.5.4.2	Fotodokumentation	21
2.5.4.3	Single-strand Conformational Analysis (SSCA)	22
2.5.4.4	Färbung mit Silbernitrat	23
2.5.5	Sequenzanalyse	23
2.5.5.1	Einzel- und Doppelstrang-Sequenzierung	24
2.5.6	Genotypisierung der Punktmutation c.1169T>G (p.Met390Arg) in Exon 12 in <i>BBS1</i>	25
3	Probanden	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse von <i>BBS1</i>	28
4.1.1	Mutationsanalyse für c.1169T>G, Exon 12 (p.Met390Arg)	29
4.1.2	SSCA und Sequenzanalyse in <i>BBS1</i>	31
4.1.2.1	Exon 4a, Primerkombination Ex4a - 145f / 387r	32
4.1.2.2	Exon 4b, Primerkombination Ex4b - 270f/508r	33
4.1.2.3	Exon 5, Primerkombination Ex5 f / r	36
4.1.2.4	Exon 7, Primerkombination BBS1-Ex7-2005-F/R	38
4.1.2.5	Exon 8, Primerkombination Ex8-102f/376r	43
4.1.2.6	Exon 9, Primerkombination BBS1-Ex9-2005-F/R	44
4.1.2.7	Exon 10, Primerkombination Ex10-93f/324r	46
4.1.2.8	Exon 12, Primerkombination Ex12-300f/r	47
4.1.2.9	Exon 13, Primerkombination Ex13f/r	49
4.1.2.10	Exon 15, Primerkombination Ex15f/r	51
4.1.2.11	Exon 16, Primerkombination Ex16 123f/316r	52
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zu <i>BBS1</i>	55
4.1.3.1	Mutationen in <i>BBS1</i>	56
4.1.3.2	Polymorphismen in <i>BBS1</i>	59
4.2	Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse von Exon 2 in <i>BBS10</i>	60
4.2.1	Mutationsanalyse für c.270_271insT (p.Cys91LeufsX5)	61
4.2.2	Mutationsanalyse für [c.253_254insA; c.254C>G] (p.Thr85LysfsX11)	66
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zu <i>BBS10</i>	68

Kapitel		Seite
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	69
4.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Mutationen p.Met390Arg (<i>BBS1</i>) und p.Cys91LeufsX5 (<i>BBS10</i>)	70
4.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der gesamten Mutationsanalyse in <i>BBS1</i> und <i>BBS10</i>	71
5	Diskussion	73
5.1	Methodendiskussion	73
5.1.1	Angewandte Methoden	73
5.1.2	SSCA und direkte Sequenzanalyse	73
5.1.3	Screening-Methoden zur Mutationssuche bei BBS-Patienten	75
5.2	Die Funktion der BBS-Gene	76
5.3	Mutationen in den Genen <i>BBS1</i> und <i>BBS10</i>	78
5.3.1	p.Met390Arg in <i>BBS1</i> und p.Cys91LeufsX5 in <i>BBS10</i>	78
5.3.2	Weitere Mutationen in <i>BBS1</i> und <i>BBS10</i>	80
5.4	Der Vererbungsmodus des BBS ist digen oder oligogen	83
5.5	Klinische Diskussion	86
5.6	Die humangenetische Beratung bei BBS-Familien	92
6	Zusammenfassung	94
7	Abkürzungen und Symbole	96
7.1	Abkürzungen	96
7.2	Symbole	98
7.2.1	Stammbaumsymbole	98
7.2.2	Symbole zur Beschreibung des Genotyps	98
8	Literaturverzeichnis	99
9	Anhang	103
9.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	103
9.1.1	Philipps-Universität Marburg	103
9.1.2	Justus-Liebig-Universität Gießen	103
9.1.3	Université de Poitiers	103
9.2	Lebenslauf	104
9.3	Danksagung	105
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	106
9.5	Poster	107

1 Einleitung

1.1 Das Bardet-Biedl-Syndrom

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS, OMIM 209900) wurde erstmals im Jahr 1920 von dem französischen Allgemeinmediziner George Bardet beschrieben (Bardet 1920). Zwei Jahre später veröffentlichte der österreichische Pathologe und Endokrinologe Artur Biedl einen ganz ähnlichen klinischen Fall (Biedl 1922). Beide Mediziner beobachteten bei ihren Patienten eine postaxiale Polydaktylie, eine Retinitis pigmentosa und eine Adipositas, drei typische Kennzeichen eines Syndroms, welches heute den Namen Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) trägt.

Es zeigte sich, dass BBS-Patienten neben diesen charakteristischen Merkmalen häufig auch verschiedenartige Fehlbildungen der Nieren und des Urogenitalbereichs sowie variable Formen der mentalen Retardierung aufweisen. Im Jahr 1999 wurden daher postaxiale Polydaktylie, retinale Dystrophie, syndrombedingte Adipositas, mentale Retardierung, renale Anomalien und Hypogonadismus als klinische Hauptkriterien des BBS-Phänotyps vorgeschlagen (Beales et al. 1999). Sie bilden seither die Grundlage zur Diagnose des Syndroms. Durch die Komplikationen der phänotypischen Merkmale ist die Lebenserwartung von BBS-Patienten leicht vermindert. Vor allem Nephropathien und hypertensionsbedingte zerebrovaskuläre Erkrankungen führen beim BBS zu einer erhöhten Mortalität (Moore et al. 2005).

Die Vererbung des BBS ist autosomal rezessiv. Wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre weisen jedoch darauf hin, dass der BBS-Phänotyp von mutanten Allelen in mehr als einem Genlocus beeinflusst wird. Es handelt sich daher beim BBS wahrscheinlich um einen digenen oder oligogenen Vererbungsmodus (Katsanis 2004). Molekulargenetische Befunde über Genotypen von BBS-Patienten können deshalb unterschiedlich sein. Auch die klinische Ausprägung des Phänotyps ist häufig variabel.

Es konnten bislang zwölf BBS-Gene (*BBS1-BBS12*) identifiziert werden, die zur Manifestation des Syndroms beitragen. Sie kodieren vermutlich alle für Proteine, die am Aufbau und der Funktion ziliärer Strukturen beteiligt sind (Abb. 1.5-2). Mutationen in BBS-Genen rufen deshalb Proteindefekte hervor, die voraussichtlich eine Dysfunktion der Zilien im gesamten Organismus provozieren können. Da Zilien eine physiologisch essentielle Aufgabe in mehreren Organsystemen des Körpers übernehmen, führt das BBS zu einer multisystemischen Erkrankung.

1.2 Epidemiologie

Das BBS ist eine äußerst seltene Erkrankung (Tab. 1.2-1). Die insgesamt höchsten Prävalenzraten von 1:13.000 bis 1:17.000 werden in Beduinenvölkern Kuwaits und in einer isolierten Neufundlandpopulation beobachtet (Farag and Teebi 1989; Teebi 1994; Green et al. 1989). In Nordeuropa und Nordamerika kommt das BBS sehr viel seltener vor, nur bei 1: 150.000 Bewohnern lässt sich ein BBS finden (Katsanis 2004). Eine Ausnahme innerhalb Europas bildet Dänemark, wo mit 1:59.000 Bewohnern ungefähr dreimal so viele Personen vom BBS betroffen sind wie in der europäischen Gesamtpopulation (Bruhl et al. 2001). Für die deutsche Population liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Zahlen vor.

Tabelle 1.2-1: Prävalenz des BBS in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen

Population	Prävalenz	Literatur
Nordamerika und Europa	1:140.000 – 160.000	(Katsanis 2004)
Dänemark	1:59.000	(Bruhl et al. 2001)
Kuwait	1:17.000	(Farag and Teebi 1989)
Beduinenvölker	1:13.500	(Teebi 1994)
Neufundland	1:13.000	(Green et al. 1989)

1.3 Diagnosestellung

Trotz der sich rasant erweiternden molekularbiologischen Erkenntnisse über das BBS basiert die Diagnostik des Syndroms noch immer auf den klinischen Merkmalen des Phänotyps. Anhand laborchemischer Parameter ist bisher keine Diagnostik möglich. Vier klinische Hauptkriterien oder drei klinische Haupt- und zwei klinische Nebenkriterien sollten zur Diagnosestellung des BBS vorliegen (Tab. 1.3-1) (Beales et al. 1999).

Es ist zu beachten, dass einige Symptome, wie zum Beispiel eine progressive Sehschwäche durch die Retinitis pigmentosa, sich erst im jugendlichen Alter manifestieren. Deshalb sind im Falle eines Verdachts auf das Vorliegen eines BBS bei einem Kind zur Diagnosestellung regelmäßige Kontrolluntersuchungen notwendig.

Tabelle 1.3-1: Kriterienkatalog für BBS (Beales et al. 1999)

Hauptkriterien	Nebenkriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Retinale Dystrophie • Postaxiale Polydaktylie • Adipositas • Mentale Retardierung • Hypogonadismus bei Männern • Renale Anomalie 	<ul style="list-style-type: none"> • Sprachstörung • Strabismus / Linsentrübung /Astigmatismus • Brachydaktylie / Syndaktylie • Entwicklungsverzögerung • Nephrogener Diabetes insipidus • Koordinationsstörung • Spastik (leicht) • Diabetes mellitus • Anomalie der Zähne • Herzfehler • Leberfibrose

1.3.1 Differenzialdiagnosen

Die hohe Variabilität des Phänotyps erschwert die Diagnostik des BBS. Oft liegt kein eindeutiges klinisches Bild vor und es müssen mehrere Differenzialdiagnosen in Betracht gezogen werden. Vor allem die Abgrenzung der im Folgenden beschriebenen Syndrome ist von Bedeutung.

1.3.1.1 Laurence-Moon-Syndrom (LMS)

Das von dem englischen Ophthalmologen John Zachariah Laurence und seinem Assistenten Robert Moon beschriebene Laurence-Moon-Syndrom (LMS) hat eine ähnliche Symptomatik wie das BBS und wird ebenfalls autosomal rezessiv vererbt (Laurence and Moon 1866). Lange Zeit wurde für beide Syndrome der Begriff Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom (LMBBS) verwendet. Beim LMS fehlt jedoch die für das BBS charakteristische Polydaktylie. Es liegt typischerweise eine spastische Paraparese vor, die beim BBS nicht zu beobachten ist. BBS und LMS sind deshalb klinisch klar zu differenzieren und seit dem Jahr 1982 werden sie als getrennte eigenständige Syndrome betrachtet (Schachar and Maumenee 1982). Der historisch geprägte Begriff Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom (LMBBS) sollte deshalb vermieden werden.

Die molekulargenetischen Grundlagen des LMS sind noch unbekannt. Jedoch konnten Moore und Mitarbeiter in einer klinischen Studie bei zwei von 46 klinisch diagnostizierte LMS-Patienten Mutationen in den Genen *BBS5* und *BBS6* nachweisen (Moore et al. 2005). Dies kann dafür sprechen, dass auch dem LMS Mutationen in BBS-Genloci zugrunde liegen. Es ist aber ebenfalls möglich, dass es sich dabei tatsächlich um BBS-Patienten handelte, die klinisch nicht korrekt diagnostiziert wurden.

1.3.1.2 McKusick-Kaufman Syndrom (MKKS)

Die klinische Trias postaxiale Polydaktylie, Hydrometrokolpos (Ödembildung im Bereich des uterovaginalen Überganges infolge von vaginalen Entwicklungsstörungen) und angeborene Herzfehler ist charakteristisch für das McKusick-Kaufman Syndrom (MKKS). Die amerikanischen Genetiker Victor A. McKusick und Robert L. Kaufman konnten nachweisen, dass diese drei Symptome zusammen autosomal-rezessiv vererbt werden (McKusick et al. 1964; Kaufman et al. 1972).

Postaxiale Polydaktylien und Hydrometrokolpos sind sowohl bei einzelnen BBS-Patienten, als auch bei MKKS-Patienten zu beobachten gewesen, sodass sich eine Verbindung der beiden Syndrome bei der Syndromentstehung vermuten ließ (David et al. 1999). Tatsächlich konnten bei MKKS- und bei BBS-Patienten Mutationen im *BBS6*-Gen (*MKKS*) gefunden werden, sodass das *MKKS*- und *BBS6*-Gen dem gleichen Genlocus entsprechen (Katsanis et al. 2000).

1.4 BBS-Gene

Es sind 12 Genloci bekannt, die im Zusammenhang mit dem BBS stehen. Eine Auflistung der BBS-Gene inklusive ihrer chromosomalen Position erfolgt in Tabelle 1.4-1. Da bei Mutationsanalysen dieser Genorte nur etwa zwei Drittel der Fälle klinisch diagnostizierter BBS-Patienten erfasst werden konnten, ist es sehr wahrscheinlich, dass noch weitere Genloci existieren.

Tabelle 1.4-1: Chromosomale Lokalisation von BBS-Genen und die Häufigkeit des Auftretens mutanter Allele bei BBS-Patienten

Gen	Position	OMIM	Mutation bei BBS-Patienten	Literatur
BBS1	11q13	209901	~23,2%	(Katsanis 2004)
BBS2	16q21	606151	~8,1%	(Katsanis 2004)
BBS3/ARL6	3p12-q13	608845	~0,4%	(Katsanis 2004)
BBS4	15q22.3-q23	600374	~1-3%	(Katsanis et al. 2001b)
BBS5	2q31	603650	~0,4%	(Katsanis 2004)
BBS6/MKKS	20p12	604896	~5,8%	(Katsanis 2004)
BBS7	4q32	607590	~1,5%	(Katsanis 2004)
BBS8/TTC8	14q31	608132	~1,2%	(Katsanis 2004)
BBS9	7q14	607968	6,3%	(Nishimura et al. 2005)
BBS10	12q21.2	610148	20,0%	(Stoetzel et al. 2006)
BBS11/TRIM32	9q31-q34.1	602290	<0,4%	(Chiang et al. 2006)
BBS12	4q27	610683	~5,0%	(Stoetzel et al. 2007)
BBS13?	Die Existenz weiterer Genloci ist wahrscheinlich.			

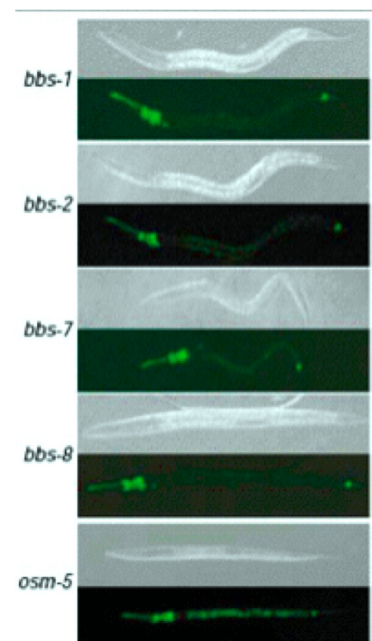
1.5 BBS, eine Erkrankung der Zilien

Bei der Analyse der Gensequenz von *BBS8* zeigte sich im putativen BBS8-Protein die Domäne eines bekannten Zilienproteins, welches im Basalkörper von Zilien lokalisiert ist. Bei einem Experiment mit dem Tiermodell *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) wurde daraufhin eine selektive BBS8-Proteinexpression in neuronalem zilienbesetzten Gewebe festgestellt. Für die Genprodukte von *BBS1*, *BBS2* und *BBS7* wurden im gleichen Experiment ähnliche Ergebnisse erhalten (Abb. 1.5-1). Dieses war der erste Nachweis für einen grundlegenden Zusammenhang der BBS-Gene mit den Proteinen des Zilienapparats (Ansley et al. 2003).

Abbildung 1.5-1:
BBS-Proteine in *C.elegans*

Mit der Kopplung an grün fluoreszierendes Protein (GFP) wird die Lokalisation der Genprodukte sichtbar.

Die Proteine von *BBS1*, -2, -7, und -8 sind gleichermaßen vor allem in Schwanz und Kopf von *C.elegans* verteilt, wo sich die größte Menge an Zilien in diesem Organismus befindet (Ansley et al. 2003).



Mit einem Hefe-Doppelhybrid-System (yeast two-hybrid system) konnte später auch das Genprodukt von *BBS4* den Zilien-Proteinen zugeordnet werden (Kim et al. 2004). Darauf folgende komparative Studien demonstrierten die Präsenz von BBS-Genen in einem Anteil des humanen Genoms, der obligat für Proteine des Zilienapparats kodiert (Li et al. 2004). Bei solchen Untersuchungen kam es zur Identifikation von *BBS3*, *BBS5* und *BBS9* innerhalb dieses Genombereichs (Chiang et al. 2004; Li et al. 2004; Nishimura et al. 2005).

In einer umfassenden Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass BBS-Proteine einen wichtigen Beitrag zur Zellpolarität leisten (Ross et al. 2005). Besonders eindrucksvoll ist hier die Untersuchung der Haarsinneszellen in der Cochlea der Maus. Bei Mutationen in *BBS1* und *BBS6* zeigten sich morphologisch abnormale Sinneszellanordnungen und klinisch Hörminderungen in der Schallwahrnehmung. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass BBS-Proteine insbesondere die Struktur und Organisation von Mikrotubuli im Zytoskelett des Zilienapparats beeinflussen.

Wie Tabelle 1.5-1 zeigt, konnten mittlerweile fast alle BBS-Proteine im Zilienapparat lokalisiert und auch die dazugehörige Funktion experimentell ermittelt werden. Einen schematischen Überblick zu Lokalisation und Funktion der Genprodukte von *BBS1-BBS8* gibt Abbildung 1.5-2.

Tabelle 1.5-1: Die BBS-Gene und ihre Proteine sowie deren Funktion

Gen	Bekannte Proteindomäne	Zelluläre Lokalisation	Vermutete Funktion	Literatur
<i>BBS1</i>	— (β -Propeller-Form)	Basalkörper/Zilium	Zilienfunktion	(Li et al. 2004)
<i>BBS2</i>	— (β -Propeller-Form)	Basalkörper/Zilium	Zilienfunktion, Flagellenformation	(Li et al. 2004)
<i>BBS3/ARL6</i>	GTP-Bindungsdomäne	Basalkörper/Zilium	Vesikeltransport	(Chiang et al. 2004)
<i>BBS4</i>	TPR/PilF	perizentrioläre Region/Basalkörper	retrograder IFT	(Kim et al. 2004)
<i>BBS5</i>	DM16/DUF1448	Basalkörper/Zilium	Zilienfunktion, Flagellenformation	(Li et al. 2004)
<i>BBS6/MKKS</i>	TCP1-Chaperon	perizentrioläre Region/Basalkörper	Mikrotubuli-assozierte Zytokinese	(Kim et al. 2005)
<i>BBS7</i>	TPR/PilF (β -Propeller-Form)	Basalkörper/Zilium	Partikelmodifizierung für IFT	(Blacque et al. 2004)
<i>BBS8/TTC8</i>	TPR/PilF	perizentrioläre Region	Partikelmodifizierung für IFT	(Blacque et al. 2004)
<i>BBS9/B1</i>	PTHB1	Zellen mit Zilien	nicht bekannt	(Nishimura et al. 2005)
<i>BBS10</i>	C12orf58 Chaperon	perizentrioläre Region/Basalkörper	nicht bekannt	(Stoetzel et al. 2006)
<i>BBS11/TRIM32</i>	E3 Ubiquitin Ligase	korreliert mit <i>BBS1</i> und <i>BBS9</i>	nicht bekannt	(Chiang et al. 2006)
<i>BBS12</i>	Chaperon Typ II	korreliert mit <i>BBS6</i> und <i>BBS10</i>	korreliert mit <i>BBS6</i> und <i>BBS10</i>	(Stoetzel et al. 2007)

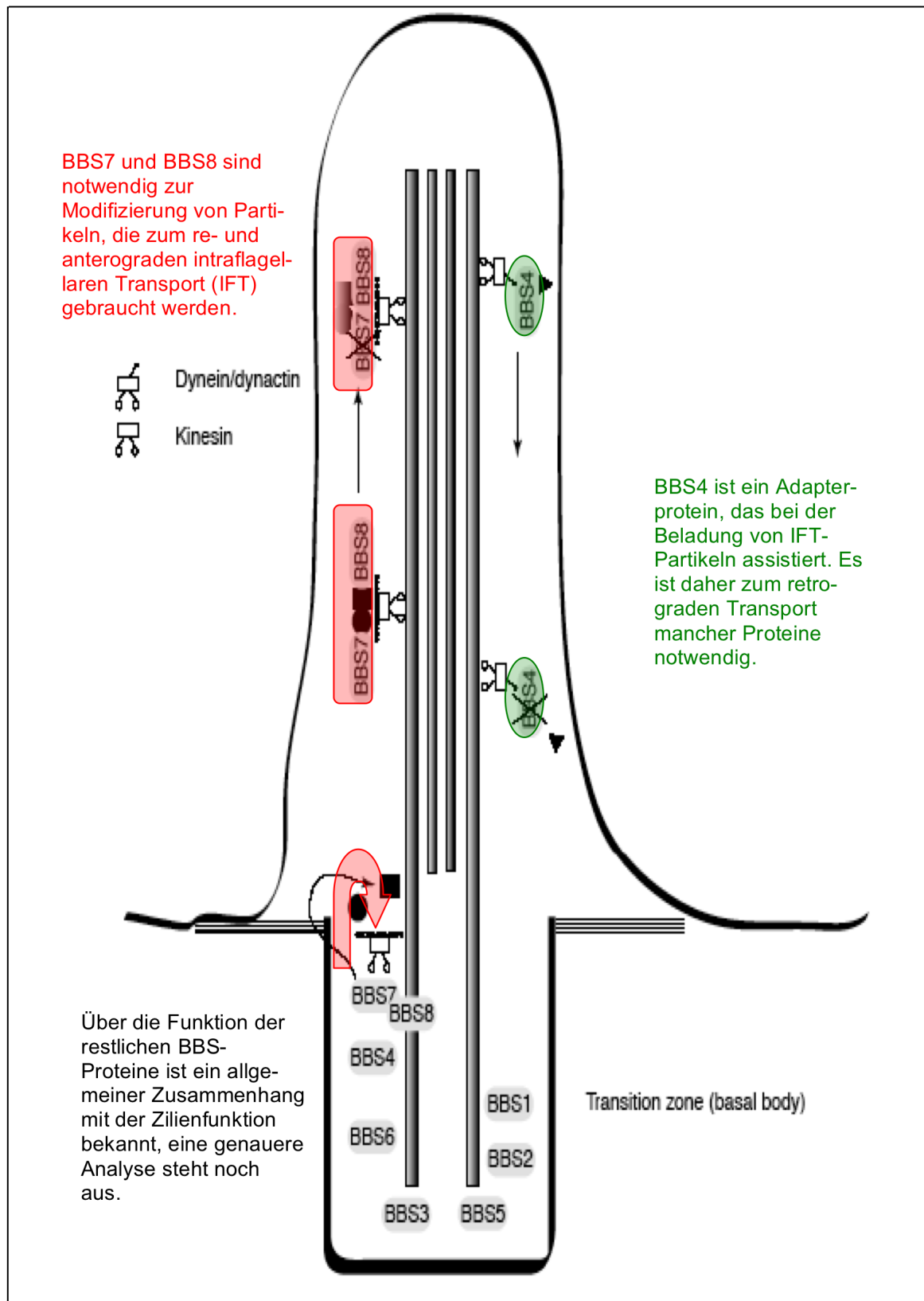


Abbildung 1.5-2: Topographische Darstellung von Lokalisation und Funktion der BBS-Proteine in einem schematisierten Zilium (Beales 2005)

1.5.1 Klinisch-pathologische Bedeutungen von Defekten im Zilienapparat

In Tabelle 1.5-2 wird versucht, den klinischen Hauptkriterien des BBS jeweils Ziliendefekte in entsprechenden Organsystemen zuzuordnen. Es kann tatsächlich für jedes phänotypische BBS-Hauptmerkmal, eine Pathologie im Zilienapparat wahrscheinlich gemacht werden. Das pathoätiologische Modell erscheint daher plausibel. Bei dieser Überlegung fällt jedoch auf, dass die soeben vorgestellte Schwerhörigkeit als Folge einer pathomorphologischen Haarsinneszellenanordnung im Innenohr bei den klinischen Diagnosekriterien ebenfalls mitberücksichtigt werden sollte (Ross et al. 2005).

Tabelle 1.5-2: Klinisch-pathologische Bedeutung von Defekten im Zilienapparat

Klinisches Hauptkriterien für BBS	Zilienfunktion, deren Defekt solch ein klinisches Bild unterstützt
Retinale Dystrophie	In den Photorezeptoren der Retina befinden sich in 9 Paaren angeordnete Mikrotubuli, diese Struktur entspricht dem Zilienaxonem (Fanghänel et al. 2003). Ziliendefekte beeinträchtigen die Funktion der Retina.
Postaxiale Polydaktylie	Unbewegliche solitary Zilien haben eine Steuerungsfunktion bei der Zellproliferation während der Embryogenese. Sie sind essentiell für die physiologische Entwicklung der Gliedmaßen.
Adipositas	Rezeptor- und Signalfehlsteuerung spielen bei der multifaktoriellen Genese der Adipositas eine große Rolle. Zilien leisten dazu einen wichtigen Beitrag.
Mentale Retardierung	Motile Zilien sind beteiligt an der Liquorzirkulation im Gehirn. Außerdem ist gerade in den langen Axonen von Nervenzellen der Partikeltransport an Mikrotubuli essentiell notwendig zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Neurons.
Hypogonadismus bei Männern	Die Spermienmotilität wird entscheidend durch Zilien beeinflusst. Eine erhöhte Rate fehlformierter Spermien kann mit einem Hypogonadismus assoziiert sein.
Renale Anomalie	Polyzystische Nierenerkrankungen stehen nachweislich im Zusammenhang mit einem Funktionsverlust primärer Zilien (Pazour and Witman 2003).
Hypakusis (bisher kein Diagnosekriterium)	Eine pathomorphologische Haarsinneszellenanordnung beeinträchtigt die Schallwahrnehmung im Innenohr (Ross et al. 2005).

1.6 Vererbung

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) wird autosomal rezessiv vererbt. Somit müssen auf zwei Allelen eines BBS-Genlocus Mutationen vorliegen, damit sich das Syndrom im Phänotyp manifestiert. Eine solche Konstellation ist bei einem homozygoten sowie auch einem compound-heterozygoten Genstatus gegeben (Abb. 1.6-1).

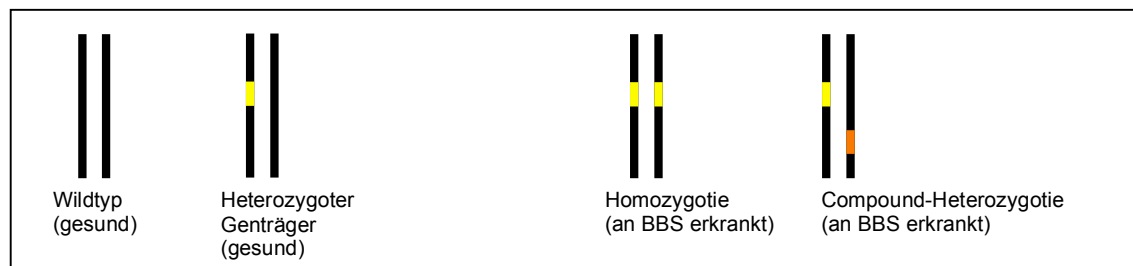


Abbildung 1.6-1: autosomal rezessive Vererbung des BBS

Molekulargenetische Analysen in BBS-Familien haben gezeigt, dass nicht nur Mutationen in einem Genlocus zur Merkmalsausprägung des BBS beitragen, sondern dass Mutationen an zwei Genorten daran beteiligt sein können (Katsanis et al. 2001a). Aus diesem Grund wird der autosomal rezessive Erbgang durch den digenen Vererbungsmodus ergänzt. Dieser beschreibt mindestens drei mutante Allele in zwei verschiedenen BBS-Genloci, weshalb er auch triallelisch genannt wird. Der Genlocus mit zwei mutanten Allelen ist dabei der Haupt-Genlocus, welcher für die Penetranz des Syndroms verantwortlich ist (Abb. 1.6-2).

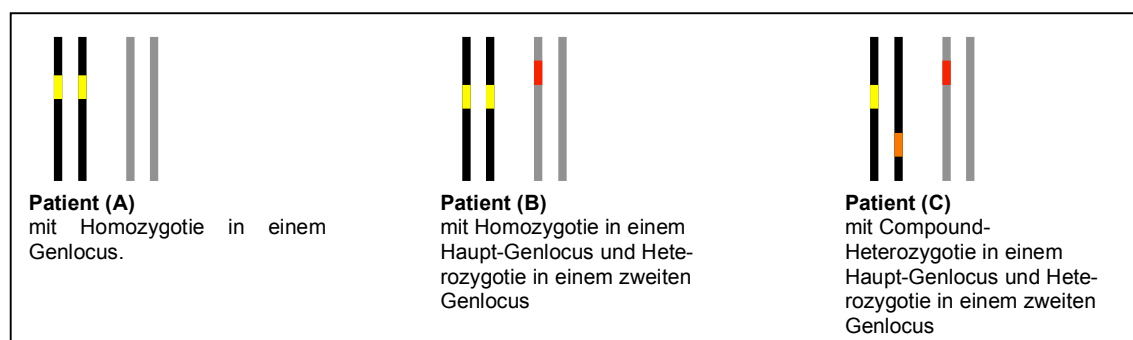


Abbildung 1.6-2: Digene Merkmalsausprägung auf drei mutanten Allelen

Es sind alle drei dargestellten Patienten von BBS betroffen aber mit jeweils unterschiedlich schwerwiegender Merkmalsausprägung.

Das dritte mutante Allel beeinflusst die Expressivität und Penetranz des Phänotyps. Dies wird zum Beispiel bei der Ausprägung der Retinitis pigmentosa deutlich, die ein klinisches Hauptmerkmal des BBS ist. In einer Studie von Beales und Mitarbeitern wird eine Familie mit drei vom BBS betroffenen Geschwistern vorgestellt, die jeweils zwei mutante Allele (p.Met390Arg) in *BBS1*, dem homozygoten Haupt-Genlocus, tragen (Beales et al. 2003).

Die typische Sehschwäche als Zeichen einer Retinitis pigmentosa manifestierte sich bei zwei der drei Geschwister schon sehr frühzeitig und führte in Form einer progressiven retinalen Degeneration bald zur Blindheit. Das dritte Geschwisterkind aber war durch eine leicht geminderte Sehfähigkeit nur wenig beeinträchtigt. Molekulargenetisch ließ sich bei den beiden schwerwiegender betroffenen Geschwistern - zusätzlich zu den mutanten Allelen in *BBS1* - ein heterozygoter Genstatus in *BBS2* mit der Mutation p.Leu349Trp nachweisen. Bei dem weniger betroffenen Geschwisterkind ließ sich keine Mutation in *BBS2* finden. Das dritte mutante Allel in *BBS2* führte deshalb in dieser Familie vermutlich zu einer stärker ausgeprägten klinischen Manifestation des BBS.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben einem zweiten auch ein dritter und vielleicht sogar ein vierter Genlocus den Phänotyp beeinflusst, spricht man beim BBS anstatt von einem digenen inzwischen von einem oligogenen Erbgang (Katsanis 2004). Am häufigsten finden sich Kombinationen der Gene *BBS2* und *BBS6*, am seltensten ist der Locus *BBS1* in oligogene Erbgänge involviert (Beales et al. 2003).

Burghes und Mitarbeiter schlagen vor, dass Mutationen, die zusätzlich zu denen des Haupt-Genlocus auftreten, einen modifizierenden Effekt haben (Burghes et al. 2001). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von modifizierenden Genen. Die Idee des autosomal rezessiven Vererbungsmodus bleibt hierbei erhalten. Katsanis und Mitarbeiter argumentieren hingegen, dass ein homozygoter oder compound-heterozygoter Genstatus zur Syndrom-Manifestation nicht ausreicht (Katsanis et al. 2001a). Ein drittes mutantes Allel in einem weiteren BBS-Gen sei essentiell für die BBS-Expressivität und Penetranz. Dieses Modell differenziert sich somit von den Mendelschen Grundsätzen des autosomal-rezessiven Erbgangs.

1.7 Fragestellung in der vorliegenden Studie

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) wird autosomal rezessiv vererbt. Voraussichtlich beeinflussen mutante Allele in mehr als einem Gen den Phänotyp, weshalb auch ein digener oder oligogener Vererbungsmodus angenommen wird. Gelingt bei einem Patienten mit dem klinisch diagnostizierten Phänotyp des BBS zusätzlich der Nachweis einer Mutation in einem der zwölf Kandidaten-Gene, so ist die Diagnose des Syndroms auch molekulargenetisch erwiesen. Im Rahmen dieser Studie wird daher das Ziel verfolgt, bei möglichst vielen klinisch diagnostizierten BBS-Patienten den zum Phänotyp gehörigen Genotyp zu bestimmen, um die Diagnose des BBS sicherzustellen.

Nach den Angaben der internationalen Literatur lassen sich bei mehr als 30% der BBS-Patienten die Punktmutation p.Met390Arg in *BBS1* (c.1169T>G, Exon 12) oder die Rastorschubmutation p.Cys91LeufsX5 in *BBS10* (c.270_271insT, Exon 2) nachweisen. Da bisher keine anderen Mutationen bekannt sind, die häufiger bei BBS-Patienten gefunden werden, ist es sinnvoll p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 zur Bestimmung des Genotyps von BBS-Patienten einzusetzen. In dieser Arbeit soll evaluiert werden, wie viele Mutationsträger sich auf diese Art innerhalb einer Studienpopulation von 76 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten detektieren lassen. Zur Genotypisierung von p.Met390Arg in *BBS1* wird ein bereits etablierter Enzymverdau durch die Restriktionsendonuklease *AvaII* angewandt. Für p.Cys91LeufsX5 in *BBS10* ist zu testen, ob eine Einzelstrang-Konformations-Analyse (single-strand conformational analysis, SSCA) des Exons 2 zur Genotypisierung der Mutation ausreicht oder ob eine direkte Sequenzanalyse notwendig wird. In *BBS1* befinden sich neben p.Met390Arg auch die meisten anderen BBS-Sequenzveränderungen. Deshalb soll bei den 76 Patienten der Studienpopulation zusätzlich eine umfassende Mutationssuche in zehn der 17 Exons des *BBS1*-Gens mit einer SSCA realisiert werden.

Da für dieses Studienkollektiv auch Ergebnisse einer bereits abgeschlossenen Mutationsanalyse in *BBS6* vorliegen, sind außerdem Überlegungen zur Existenz eines di- und oligogenen Vererbungsmodus möglich (Frick 2007). Sollten bei Patienten der Studienpopulation in mehr als einem der Gene (*BBS1*, *BBS6* oder *BBS10*) pathogene Mutationen zu verzeichnen sein, wäre das Modell des di- und oligogenen Vererbungsmodus auch in der hier getesteten Population zu unterstützen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav

ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Einmachfolie (Zellglas)

Hamilton Spritze

Hoefer SE 600 Elektrophorese Unit

Reaktionsgefäße:

- Falcon Tubes (50 ml)
- MicroAmp Reaction Tubes
- Micro Test Tubes (1,5 ml)
- MicroTubes (0,5 ml)

Schüttelinkubator G25

Thermoblock Techne DB 3

Thermocycler :

- GeneAmp PCR System 9600
- TRIO Thermoblock TB1
- T-Gradient

UV-Transilluminator UVT-40M

MS2 Minishaker

Präzisionswaage 2254

Wasserbäder:

- Typ 1083
- Typ M3

Zentrifugen:

- Sorvall RT 6000B
- Eppendorf 5415 R Kühlzentrifuge
- Eppendorf 5415 C Zentrifuge
- Biofuge 13
- Labofuge 400

Gössner, Hamburg

Applied Biosystems, USA

Folia Paper, Wendelstein

Hamilton, Schweiz

Amersham, Freiburg

Falcon, USA

Perkin Elmer Cetus, USA

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

New Brunswick Scientific, USA

Kobe, Marburg

Applied Biosystems, USA

Biometra, Göttingen

Biometra, Göttingen

Herolab, Wiesloch

IKA Works Inc., USA

Sartorius, Göttingen

GFL, Burgwedel

Lauda, Königshofen

DuPont, Dreieich

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Haereus, Hanau

Haereus, Hanau

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Sigma (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Riedel-de-Haen (Seelze), AppliChem (Darmstadt), Serva (Heidelberg).

2.1.3 Medien und Standardlösungen

Zur Sterilisation wurden Medien und Lösungen 30 min bei 121°C autoklaviert. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Puffer und Lösungen Aqua dest. benutzt.

2.2 Detaillierte Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Medien

2.2.1 Materialien für die DNA-Extraktion

RCLB-Puffer	10 mM Tris 5 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen
Proteinkinase K	Promega, Madison, USA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0 mit 1 M Salzsäure einstellen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

2.2.2 PCR-Reagenzien

10 x Reaktionspuffer S	Peq Lab, Erlangen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Peq Lab, Erlangen
MgCl ₂ (25 mM)	Peq Lab, Erlangen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
HPLC-Wasser	High-Performance-Liquid-Chromatography (chromatographisch gereinigtes Wasser)

2.2.3 DNA-Längenstandards

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
O'Range Ruler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

2.2.4 Ladepuffer

6 x Orange-Loading-Dye für Agarosegel	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
PAA-Gelladepuffer	95% Formamid 20 mM EDTA (pH 7,4) 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol

2.2.5 Materialien für die Agarosegele

Agarose-Pulver	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

2.2.6 Lösungen für die Polyacrylamidgele

Rotiphorese® 10xTBE-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel A	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel B	Roth, Karlsruhe
TEMED p.a.	Roth, Karlsruhe
APS	10% (w/v) Ammoniumpersulfat in H ₂ O
Milli-Q-Wasser	doppelt destilliertes Wasser

2.2.7 Lösung für die Gelelektrophorese

5 x TBE-Puffer	0,45 M Tris
	0,45 M Borsäure
	10 mM EDTA

2.2.8 Chemikalien für Silberfärbung

Ethanol (>99,8%)	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Milli-Q-Wasser	doppelt destilliertes Wasser
Salpetersäure (65%)	Merck, Darmstadt
Glycerol (87%)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumkarbonat	Riedel-de-Haen, Seelze
Formaldehyd (mind. 37%)	Merck, Darmstadt

2.2.9 Fertigsysteme (Kits) zur Sequenzierung

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRISM® Big Dye® Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit	ABI, Applied Biosystems, USA

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Roth (BRD) in *desalted* Qualität bezogen. Sie wurden zur PCR-Amplifizierung und zur Sequenzierung von DNA-Templates benötigt.

2.3.1 Oligonukleotide für *BBS1*

Das *BBS1*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert (11q13) und hat eine genomische Sequenz von ungefähr 23kb. Darin liegen 17 Exons verschiedener Größe, die zusammen eine cDNA von 3370bp ergeben (Referenzsequenz: NM_024649.4). Es entsteht daraus ein Protein von 593 Aminosäuren (Referenzsequenz: NP_078925.3) (Mykytyn et al. 2002).

Wie aus Tabelle und Abbildung 2.3-1 hervorgeht, variieren die 17 Exons in ihrer Länge von 35bp bis 1663bp. Um ein für die SSCA geeignetes PCR-Produkt der Länge von 150-350bp zu erhalten, mussten die Primer sehr sorgfältig ausgewählt werden. Bei kleineren Exons liegen die Primer in benachbarten Introns oder Exons. Das Exon 4 wurde wegen seiner Länge von 273bp in zwei überlappende Fragmente (4a und 4b) aufgeteilt. In Tabelle 2.3-2 werden die Oligonukleotide für *BBS1* aufgelistet.

Es wurden Primer für alle Exons außer Exon 11, -14 und -17 gelegt. Bei Exon 1, -2, -3 und -6 wurden mehrere Versuche der PCR-Amplifikation unternommen, jedoch ließ sich keine passende Annealingtemperatur finden (Tab. 2.3-3), sodass sie ebenfalls aus der Studie entfallen mussten.

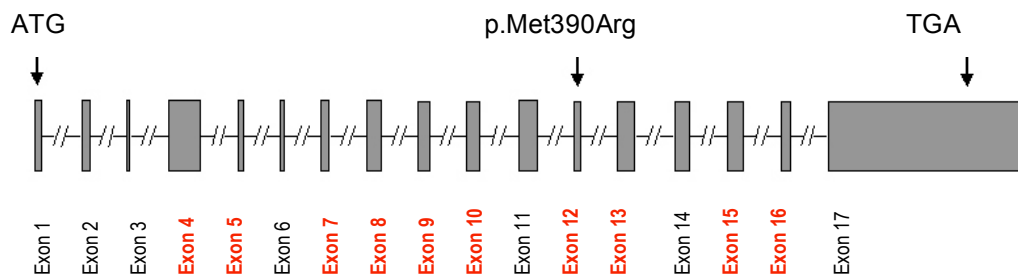


Abbildung 2.3-1: Genstruktur von *BBS1* (Mykytyn et al. 2002)

Die Rechtecke stellen die 17 Exons dar. Im Rahmen dieser Studie untersuchte Exons sind fett gedruckt und rot markiert. Das Startkodon ATG liegt in Exon 1, das Stoppcodon TGA in Exon 17. Die häufigste Mutation p.Met390Arg, ein Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G), liegt in Exon 12 (c.1169T>G).

Tabelle 2.3-1: Exon- und Introngrößen von *BBS1* (Mykytyn et al. 2002)

Exon	Größe in bp	Intron	Größe in kb
Exon 1	59	Intron 1	0,3
Exon 2	77	Intron 2	0,1
Exon 3	35	Intron 3	3,2
Exon 4	273	Intron 4	0,9
Exon 5	47	Intron 5	0,1
Exon 6	39	Intron 6	0,1
Exon 7	73	Intron 7	3,7
Exon 8	132	Intron 8	1,5
Exon 9	107	Intron 9	2,1
Exon 10	121	Intron 10	0,1
Exon 11	159	Intron 11	2,2
Exon 12	70	Intron 12	0,5
Exon 13	159	Intron 13	3
Exon 14	134	Intron 14	0,9
Exon 15	135	Intron 15	0,6
Exon 16	87	Intron 16	0,2
Exon 17	1663	—	—

Tabelle 2.3-2: Beschreibung der Oligonukleotide für *BBS1*

Exons, die in dieser Studie untersucht wurden, sind grau unterlegt
(Kleinbuchstaben kennzeichnen die intronsische Lage der Primer, Großbuchstaben ihre Lage im Exon)

Exon	Primer	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Produkt (bp)	Temp. (°C)	Exon-Lokalisation (NM_024649.4)	
1	forward	BBS1-Ex1-2005-F	cccggaacctttgtactc	299	Etablierung erfolglos		
	reverse	BBS1-Ex1-2005-R	ctccagacacacatatgcac				
	1neu	forward	BBS1-Ex1-2005neu-F	ctgagacagattcctcaacc			317
	reverse	BBS1-Ex1-2005neu-R	taagagtccctccagactgc				
2	forward	BBS1-Ex2-2005-F	taccagacggttctgtacct	251			
	reverse	BBS1-Ex2-2005-R	acaggaccattgtctgactc				
3	forward	BBS1-Ex3-2005-F	ttctgagactctggttttgg	291			
	reverse	BBS1-Ex3-2005-R	cccagaaaatatttgatctgc				
4a	forward	Ex4a-145f	agaagaggggtcagtggaagg	243	57	c.160_338	
	reverse	Ex4a-387r	tagacacaagggcctgaagc				
4b	forward	Ex4b-270f	CACTGGTGATGACCGAAAG	239	57	c.221_432	
	reverse	Ex4b-508r	TTCCCAACTCCCATGTTATT				
5	forward	Ex5 f	TAGACATTGGGTTTCCTGCC	232	58	c.433_479	
	reverse	Ex5 r	AAGGCTCCTCTGCCGTCT				
6	forward	BBS1-Ex6-2005-F	CCTTAACCTGAAGGAGATG	320	Etablierung erfolglos		
	reverse	BBS1-Ex6-2005-R	AGCTGCAGAAACctagacac				
7	forward	BBS1-Ex7-2005-F	TCCAGTCACTCAGgtaagga	315	58	c.519_591	
	reverse	BBS1-Ex7-2005-R	ctggttgggttttgcttatag				
8	forward	Ex8-102f	gcattctggggagtatcttgg	275	62	c.592_723	
	reverse	Ex8-376r	agaactaactgtggagcatgg				
9	forward	BBS1-Ex9-2005-F	aaactgggtgtaagtgaagga	317	55	c.724_830	
	reverse	BBS1-Ex9-2005-R	taaagcccactctcatcttg				
10	forward	Ex10-93f	GGAGGGTCAGCCATAGAAGT	228	60	c.831_1110	
	reverse	Ex10-324r	TAGGGACATAGGCGTGGAG				
11	forward	keine Primer gelegt					
	reverse						
12	forward	Ex12-300f	TATTTCAAGGCAGCGATTC	300	60	c.1111_1180	
	reverse	Ex12-300r	ATGCTTCATTTCCACCTCCT				
13	forward	Ex13f	GTTTGGGGAAGAAAGAATGG	302	58	c.1181_1339	
	reverse	Ex13r	ATTCCCCAGCTTTGCTGT				
14	forward	keine Primer gelegt					
	reverse						
15	forward	Ex15f	CCAGGTCCTAAGGGCTTTCT	215	58	c.1474_1608	
	reverse	Ex15r	GGCCTTTCCCACTCCATATC				
16	forward	Ex16-123f	gggctggtttccttacttct	194	57	c.1609_1695	
	reverse	Ex16-316r	gttggcactcacccttactg				
17	forward	keine Primer gelegt					
	reverse						

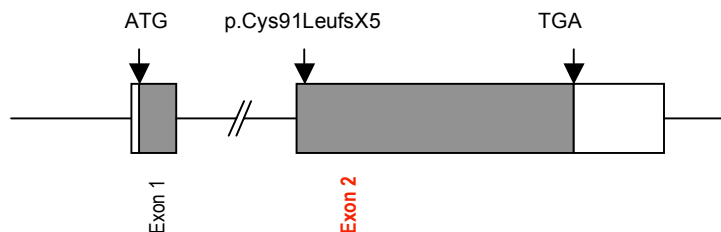
Tabelle 2.3-3: erfolglose Etablierungsversuche der PCR-Amplifikation von Exon 1,2,3 und 6

Exon	Temperatur (°C)	Zusätze	Exon	Temperatur (°C)	Zusätze
1	48, 50, 52, 54, 55, 57, 60	keine	3	46,9 - 63,5	keine
	48, 50, 52, 54, 55, 57, 60	MgCl ₂		46,9 - 63,5	MgCl ₂
	50	Formamid		46,9 - 63,5	DMSO+MgCl ₂
	50	DMSO		46,9 - 63,5	Formamid
2	46,9 - 63,5	keine	6	46,9 - 63,5	keine
	46,9 - 63,5	MgCl ₂		46,9 - 63,5	MgCl ₂
	46,9 - 63,5	DMSO+MgCl ₂		46,9 - 63,5	DMSO+MgCl ₂
	46,9 - 63,5	Formamid		46,9 - 63,5	Formamid

2.3.2 Oligonukleotide für *BBS10*

Das *BBS10*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 12 (12q21.2). Die genomische Sequenz erstreckt sich über ca. 3,9kb, während die mRNA (NM_024685.2) noch 2 Exons von insgesamt 3347bp enthält. Das kleinere Exon 1 entspricht 266bp, Exon 2 umfasst dagegen 3081bp. Das resultierende *BBS10*-Protein besteht aus 723 Aminosäuren (NP_078961.3) (Stoetzel et al. 2006). In der Abbildung 2.3-2 wird die Struktur von *BBS10* dargestellt.

Da die meisten Sequenzvarianten im Exon 2 lokalisiert sind, ist für die vorliegende Studie beschlossen worden, Exon 1 zu vernachlässigen und nur eine molekulare Mutationsanalyse von Exon 2 durchzuführen. Mit dem in der Tabelle 2.3-4 vorgestellten Primerpaar wurde ein PCR-Produkt der Länge 214bp erhalten, das für eine SSCA geeignet war. Es beginnt im Intron 1, 53bp vor dem Exon 2, und reicht bis zur Stelle c347T.

**Abbildung 2.3-2: Genstruktur von *BBS 10* (Stoetzel et al. 2006)**

Die Rechtecke stellen die beiden Exons dar. Im Rahmen dieser Studie untersuchte Exons sind fett gedruckt und rot markiert.

Der kodierende Sequenzanteil ist grau eingefärbt. Das Startkodon ATG liegt in Exon 1, die häufigste Mutation p.Cys91LeufsX5 (c.270_271insT) und das Stoppkodon TGA in Exon 2. Da Stoetzel und Mitarbeiter eine andere Nomenklatur zur Benennung von Mutationen verwendet haben, wird p.Cys91LeufsX5 von ihnen mit der Formel C91fsX95 bezeichnet.

Tabelle 2.3-4: Beschreibung der Oligonukleotide für *BBS10*

(Kleinbuchstaben kennzeichnen die intronsische Lage der Primer, Großbuchstaben ihre Lage im Exon)

Exon	Primer	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Produkt	Annealing Temperatur
1	forward			Keine Primer gelegt	
1	reverse				
2	forward	BBS10, 62f	tggttttaagatgtgggaag	214bp	60°C
2	reverse	BBS10, 275r	ATGGGTTTGAATGTTTT	214bp	60°C

2.4 Software und Datenbanken

2.4.1 Software

Textverarbeitung	Microsoft Word 2004 für Mac
Datenverwaltung	Microsoft Excel 2004 für Mac
	Access 2000, Microsoft
Literaturverwaltung	Endnote 9.0, Thompson
Grafik	Microsoft PowerPoint 2004 für Mac
	iPhoto 2.0, Apple
	Adobe Photoshop 5.5
Sequenzanalyse	Sequencher 4.1, Gene Codes

2.4.2 Versuchsplanung und Ergebnisverwaltung

Zur Versuchsplanung, der Verwaltung der Ergebnisse sowie der Dokumentation aller durchgeführten Analysen existiert seit dem Jahr 2004 eine Access-Datenbank (BBS-Datenbank), in der alle BBS-Patienten eingetragen sind, die in dieser Studie untersucht wurden.

Für Recherche und Ergebnis-Evaluation wurde auf weitere Datenbanken aus dem Internet zurückgegriffen, die in Tabelle 2.4-1 aufgelistet werden.

Tabelle 2.4-1: Datenbanken aus dem Internet

Datenbank	Internetadresse
NCBI (National Center of Biotechnology Information)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	http://www.embl-heidelberg.de
UCSC – Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu
HGMP (Human Genome Mapping Project Resource Center)	http://www.hgmp.mrc.ac.uk
HUGO Nomenclature Committee	http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
HGVS (Human Genome Variation Society)	http://www.hgvs.org/mutnomen/

2.4.3 Referenzsequenzen

In Tabelle 2.4-2 werden die Referenzsequenzen aufgeführt, welche für die Primer-Auswahl und die Sequenzanalyse verwendet wurden.

Tabelle 2.4-2: Beschreibung der Referenzsequenzen für *BBS1* und *BBS10*

Sequenz	<i>BBS 1</i>	<i>BBS 10</i>
Genomische DNA	BBS1 (NM_024649) at chr11:66034695-66057660	BBS10 (NM_024685) at chr12:75240734-75244690
	http://genome.ucsc.edu	http://genome.ucsc.edu
cDNA/mRNA (Accession Number)	NM_024649.4	NM_024685.2
Protein (Accession Number)	NP_078925.3	NP_078961.3

2.4.4 Nomenklatur von Sequenzveränderungen

Die Beschreibung von Sequenzveränderungen erfolgte nach der gängigen Nomenklatur in Anlehnung an die Empfehlungen der Human Genome Variation Society vom August 2006 (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>; (den Dunnen and Antonarakis 2000). Falls zitierte Autoren eine andere Nomenklatur verwendet haben, sind Differenzen in der Benennung von Sequenzveränderungen möglich.

2.5 Experimentelle Methoden für die molekulargenetischen Analysen in *BBS1* und *BBS10*

Nach DNA-Gewinnung aus Blutleukozyten wurden die Exons des jeweiligen Gens mittels PCR einzeln amplifiziert. Danach erfolgte eine Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA). DNA-Proben, die hier ein Fragmentmuster zeigten, das von der Mehrheit aller Proben abwich, wurden erneut untersucht und bei wiederholbarer SSCA-Auffälligkeit sequenziert. In *BBS10* sollte bei Misslingen der SSCA auf die direkte Sequenzanalyse zurückgegriffen werden.

2.5.1 DNA-Präparation aus Blutleukozyten

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde EDTA-Blut der Probanden verwendet, welches zuvor bei -20°C eingefroren gelagert worden war. 10 ml Blut wurden mit 30ml Red Cell Lysis Buffer (RCLB) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lysierten die Erythrozyten im hypotonischen Puffer. Die Leukozyten blieben intakt und konnten durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 3000 rpm, 4°C) sedimentiert werden. Das Pellet aus Leukozyten wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl SDS (10%) und 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde die Suspension bei 55°C über 3h schüttelnd inkubiert. Danach wurden die abgebauten Proteinreste durch Zugabe von 2 ml NaCl (5 M) ausgefällt, und bei Raumtemperatur abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Der DNA-haltige Überstand wurde mit 40 ml eiskaltem 95%igem Ethanol (EtOH) gefällt. Die DNA wurde mit einem sterilen Glashaken entnommen, mit 70%igem EtOH gewaschen und in ca. 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

2.5.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA wurde anhand der optischen Dichte im Spektralphotometer bestimmt. Das Absorptionsmaximum von DNA der Dichte 50 ng/µl liegt bei 260 nm Wellenlänge. Hier entspricht die Extinktion 1 ($E=1$). Die Konzentration der gemessenen DNA kann also nach dem Dreisatz-Prinzip folgendermaßen berechnet werden:

$$c[\text{DNA } (\mu\text{g/ml})] = E_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor } (\mu\text{g/ml})$$

Bevor eine Probe der DNA in die Küvette des Photometers eingebracht werden kann, wird sie verdünnt (z.B. 1:50). Dieser Verdünnungsfaktor wird in der Rechnung mitberücksichtigt.

Die DNA wurde über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm gemessen. Der Quotient aus E_{260} und E_{280} ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen, da das Absorptionsmaximum für Proteinverunreinigungen bei 280nm liegt. E_{260}/E_{280} sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Standardmethode zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte (Templates). Der Prozess besteht aus dreiteiligen Temperaturzyklen: der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Diese drei Schritte werden bis zu 35mal durchlaufen.

Bei 95°C wird der DNA-Doppelstrang denaturiert. Nach Temperaturabsenkung auf eine Primerspezifische Annealing-Temperatur zwischen 55°C und 62°C kommt es zur Anlagerung des Primerpaars an die beiden gegenläufigen DNA-Stränge des Templates, der Primerhybridisierung. Darauf folgt bei erneutem Temperaturanstieg auf 72°C die Elongation der 3'-Enden der Primer durch eine DNA-Polymerase. Die Abfolge der Temperaturzyklen ist in Tabelle 2.5-1 dargestellt.

Es entsteht auf diese Weise jeweils ein komplementärer Strang, der im folgenden Zyklus als zusätzliche DNA-Matrize für den anderen Primer-Partner dient. Die Menge des amplifizierten Produkts steigt so exponentiell an.

Tabelle 2.5-1: Beispiel eines Standard PCR-Programms

Reaktionsschritt	Temperatur °C	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	3 min.	1
Denaturierung	95	15 sec.	
Hybridisierung	52-64	15 sec.	28-35
Elongation	72	30 sec.	
Elongation	72	4 min.	1

2.5.3.1 PCR-Optimierung

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe der Internetseite http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Primer 3 erlaubt die Einstellung zahlreicher Parameter, die für die jeweilige Anwendung der Primer eingestellt werden können.

Bevor die PCR durchführbar ist, muss die Annealing-Temperatur ermittelt werden, bei der sich die Primer an den DNA-Strang anlagern. Besonders vorteilhaft ist hierbei die Verwendung eines Gradientencyclers, bei dem mehrere Annealing-Temperaturen in einem PCR-Zyklus ausgetestet werden können. Bei Bedarf wird das Produkt außerdem durch Zusätze wie MgCl₂, DMSO oder Formamid spezifiziert.

Die meisten Templates konnten mit geeigneten Primerpaaren unter Standardbedingungen amplifiziert werden. Die Annealing-Temperatur wurde für Spezifität und Ausbeute des PCR-Produktes optimiert. Einige Exon-Templates jedoch ließen sich nicht vervielfältigen, sodass sie aus dieser Studie entfallen mussten (*BBS1* Ex 1, -2, -3, -6).

2.5.4 Gelelektrophorese

Es wurden sowohl Agarose- als auch Polyacrylamidgele zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. In Agarosegelen wurde das PCR-Produkt kontrolliert, während die Polyacrylamidgele zur Durchführung der SSCA dienten.

2.5.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 40 kb erfolgte in 2%igen Agarosegelen. Ein 2%iges Gel des Volumens 300 ml wurde 40 Minuten unter einer Spannung von 300 Volt gehalten. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer vermischt, um das Befüllen der Geltaschen zu erleichtern und die Laufweite im Gel später besser abschätzen zu können.

2.5.4.2 Fotodokumentation

Um die DNA unter UV-Licht sichtbar machen zu können, wurden die Agarosegele vor dem Gießen mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt (10 µl der EtBr-Stammlösung (c=10 mg/ml) auf 100 ml des Agarosegels). Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und mit E.A.S.Y.Rh3 Software (Herolab) ausgewertet. So konnte die Ausbeute einer PCR beurteilt werden.

2.5.4.3 Single-strand Conformational Analysis (SSCA)

Zur Mutationssuche in den Kandidatengenomen wurde die Einzelstrang-Konformations-Analyse eingesetzt (single strand conformational analysis, SSCA). Dazu wird denaturierte, einzelsträngige DNA auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetragen (Abb.2.5-1).

Im renaturierenden Gel nimmt ein DNA-Einzelstrang durch Basenpaarung mit sich selbst eine komplexe dreidimensionale Konformation ein (Sekundärstruktur). Diese ist sowohl abhängig von der Temperatur als auch von der Nukleinsäuresequenz (Primärstruktur). Die Migrationsgeschwindigkeit des Einzelstrangs wird durch seine Sekundärstruktur im Elektrophoresegel entscheidend beeinflusst. Schon eine einzige Basenveränderung kann zu einer individuellen Einzelstrang-Konformation und somit zu auffälligem Laufverhalten des Fragments im PAA-Gel führen.

Die nicht denaturierten Doppelstrang-Reste wandern dabei in der Elektrophorese am weitesten in Richtung Anode und sind deshalb am unteren Rand des PAA-Gels als abschließende Bande zu finden. Die Einzelstrangfragmente sind im oberen Teil des Gels lokalisiert. Beide tragen zur Ergebnisinterpretation der SSCA bei, obwohl es sich bei dem SSCA-Muster der Doppelstrang-Reste streng genommen um gar keine single-strand conformational analysis handelt und die Konformation der Einzelstränge öfter zu individuellen Fragmentmustern führt.

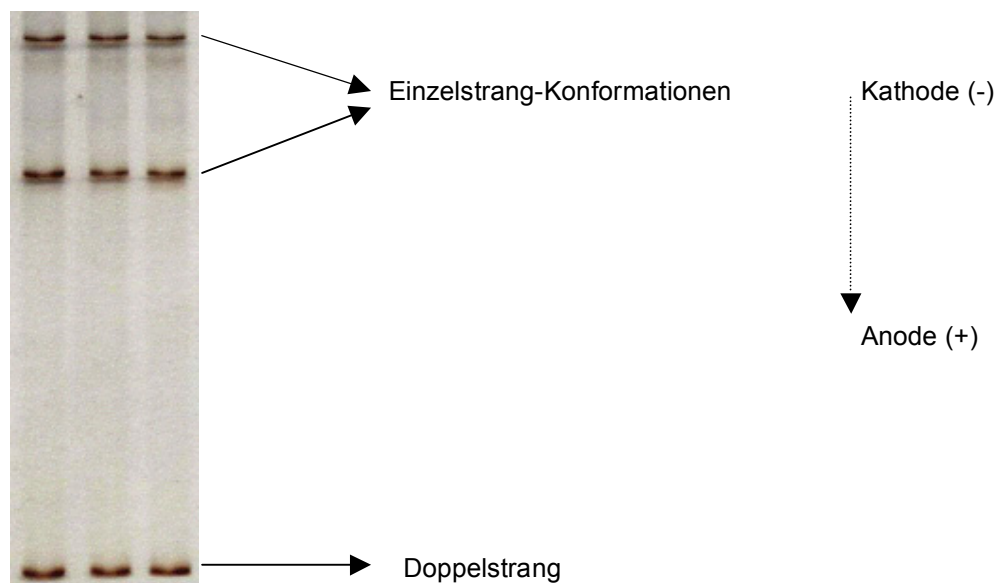


Abbildung 2.5-1: Beispielhaftes SSCA Ergebnis

Die Durchführung der SSCA ist nur unter bestimmten methodischen Bedingungen erfolgreich. So müssen Gelkonzentration, Gellauftemperatur und Größe der PCR-Produkte zuvor sorgfältig etabliert sein. Die optimale Größe der PCR-Produkte liegt zwischen 150–350bp.

Das Kandidatengen wurde aus genomischer DNA in Form überlappender PCR-Produkten von 194-320bp amplifiziert. Mit Ausnahme des Exons 4 in *BBS1* konnte eine Untersuchungsgliederung nach Exons vorgenommen werden. Exon 4 wurde wegen einer Größe von mehr als 350bp in ein Exon 4a und -4b aufgeteilt.

Die Produkte wurden mit SSCA-Ladepuffer (formamidhaltig) und HPLC-Wasser versetzt, bei hohen Temperaturen (95°C) denaturiert und danach auf ein nicht-denaturierendes PAA-Gel (Gelkonzentration 12%, 49:1) aufgetragen. Anschließend wurde bei 2 Gellauftemperaturen eine Elektrophorese bei 0,5kV durchgeführt. Bei einer Temperatur von 20°C hielt man die Spannung über 90 Minuten aufrecht, bei 10°C über 120 Minuten.

Nachdem die DNA-Fragmente im Gel je nach Laufeigenschaft verankert sind, muss zur Auswertung der SSCA ihre Position detektierbar gemacht werden. Dafür wurde hier die nicht-radioaktive Methode der Silberfärbung gewählt.

2.5.4.4 Färbung mit Silbernitrat

Bei der Silberfärbung lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an. Durch das in der Entwicklerlösung enthaltene Formaldehyd werden die Silberionen reduziert und anschließend mit Natriumcarbonat gefällt. Das Gel wurde vorsichtig so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis die Banden der Fragmente die gewünschte Farbtintensität zeigten. Durch Einlegen des Gels in den Fixierer (10% Essigsäure) wurde die Reaktion abgestoppt.

Die so gefärbten Gele wurden in Zellglas (Einmach-Folie) verpackt und getrocknet, um im Anschluss ausgewertet zu werden. Sie sind in diesem Zustand dauerhaft haltbar und gut aufzubewahren.

10% Ethanol	5 min
1% Salpetersäure	8 min
H ₂ O (milli-Q)	1 x kurz spülen
Silbernitrat-Lösung	20 min
H ₂ O (milli-Q)	3 x gründlich spülen
Entwickler	in der Lösung bewegen, bis sich Fragmente zeigen
Fixierer	2 min
H ₂ O (milli-Q)	1 x 2 min spülen
Konservierer	mindestens 30 min inkubieren

Lösungen:

Silbernitrat-Lösung	12 mM AgNO ₃
Entwickler	0,14 M Na ₂ CO ₃ 0,038% Formaldehyd
Fixierer	10% Essigsäure
Konservierer	20% Ethanol 5% Glycerol

2.5.5 Sequenzanalyse

Zur Mutationsanalyse in *BBSI* wurden ausgewählte DNA-Fragmente sequenziert, die in der SSCA ein auffälliges Muster boten und vom Laufverhalten der meisten anderen Proben abwichen. Zur Mutationsanalyse in *BBSI0* wurden alle Proben direkt sequenziert.

Zur Vorbereitung wurde das entsprechende PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Anschließend folgte der Ansatz für die Sequenzreaktion mithilfe des ABI PRISM® Big Dye® Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit, um danach die Sequenzierung im automatischen Sequenziergerät ABI 310 durchzuführen.

Die Methode des Cycle Sequencing in der Sequenzreaktion folgt dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger, wobei die *in vitro* DNA Polymerisation unter den Bedingungen einer PCR durchgeführt wird (Sanger et al. 1977). Da man nur einen Primer verwendet, erfolgt die Anreicherung der DNA nicht potentiell, sondern linear. Neben Desoxynukleotiden eines gewöhnlichen PCR-Ansatzes, werden basenspezifisch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zugegeben. Diese führen bei Einbau zu einem Kettenabbruch, sodass DNA-Einzelstrangfragmente verschiedener Länge entstehen, die entsprechend ihrer letzten Base präzise fluoreszenzmarkiert sind. Im Sequenziergerät wandern diese DNA-Einzelstränge durch eine Gelkapillare. Anhand der Fragmentlänge und dem Signal des Fluoreszenzmarkers erkennt das Gerät Position und Art der letzten Base des Fragments. Da im Ansatz DNA-Stränge jeder Länge des Templates von der ersten bis zur letzten Base vorhanden sind, kann man für jede Position ein spezifisches Basensignal erhalten.

Mit der angegliederten Software von ABI (Sequencher und Sequence Navigator) konnten die Ergebnisse graphisch dargestellt (Chromatogramm) und ausgewertet werden. Die zu analysierende DNA wurde dem Template einer anderen DNA-Probe gegenübergestellt, die in der SSCA das am häufigsten zu beobachtende und somit unauffällige Laufmuster zeigte. Beide wurden gleichzeitig auch mit der Referenzsequenz des Wildtyps verglichen, um gemeinsame Abweichungen festzustellen (Tab. 2.4-2).

2.5.5.1 Einzel- und Doppelstrang-Sequenzierung

Zur Auswertung der Sequenzen war es in einigen Fällen notwendig, eine Einzelstrang-Sequenzierung durchzuführen. Hier wird der Unterschied zwischen Einzel- und Doppelstrang-Sequenzierung dargestellt und erläutert, wann welche der beiden Methoden anzuwenden ist.

Zur Sequenzierung wird die DNA jeweils einmal mit dem Forward-Primer und dem Reverse-Primer in der PCR amplifiziert. Ausgewertet werden so eine Forward- und eine Reverse-Sequenz (Abb. 2.5-2).



Abbildung 2.5-2: Anlagerung des F- (rot) und R- (blau) Primers an einen DNA-Doppelstrang

Als Standard diente in dieser Studie die Doppelstrang-Sequenzierung, bei der sich die Ergebnisse des mütterlichen und des väterlichen Allels überlagern:

Das Produkt genomischer DNA diploider somatischer Zellen (hier: Leukozyten), ergibt 4 Einzelstrang-Produkte, je ein Forward-DNA-Strang sowie je ein Reverse-Strang mütterlichen und väterlichen Erbguts (Abb. 2.5-3). Bei der Untersuchung einer Forward-Sequenz fluoreszenzmarkierter DNA im automatischen Sequenziergerät ABI 310 überlagern sich also Signale für Aminosäuren (AS) der mütterlichen als auch der väterlichen Forward-Sequenz. Bei Reverse-Sequenz verhält es sich ebenso.

Im Falle einer Homozygotie sind die Signale identisch, bei einer heterozygoten Mutation aber überlagern sich zwei unterschiedliche Signal-Wellen.

Kommt es durch Insertion oder Deletion zum Frameshift in einem Allel, so wird das Sequenzier-Ergebnis ab der Mutation nicht mehr interpretierbar. In diesem Falle ist eine Einzelstrang-Sequenzierung erforderlich, die mütterliche von väterlicher DNA trennt

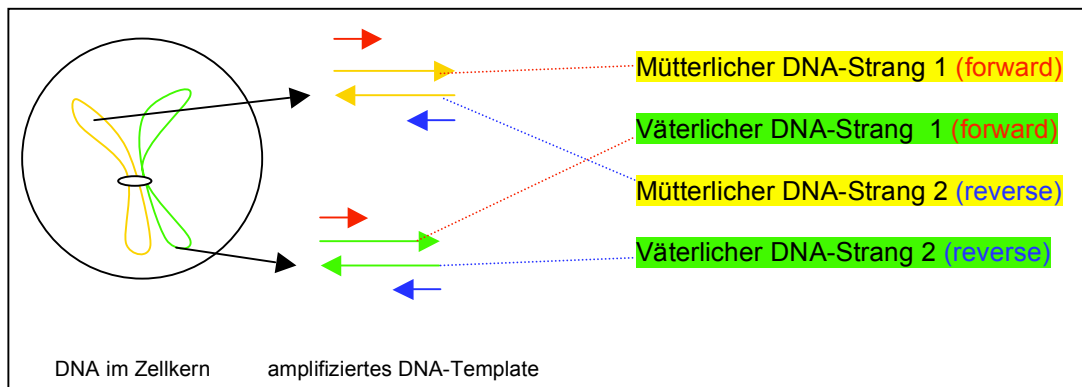


Abbildung 2.5-3: Aufgliederung des DNA-Produkts eines Leukozyten

Es stehen mehrere Methoden zur Trennung der Einzelstränge zur Verfügung. Hier sollen nur zwei davon kurz vorgestellt werden:

a) Banden-Aussteichen

Wenn das denaturierte Produkt in einem SSCA-Gel vorliegt, können angefärbte Banden differenziert ausgestochen werden. Sie werden in Wasser gelöst, mittels PCR reamplifiziert und anschließend nach Aufreinigung sequenziert. So wird versucht, präzise den Einzelstrang zu untersuchen, der in der SSCA ein spezifisches meist auffälliges Laufverhalten gezeigt hat.

b) TOPO TA Cloning®

Hier werden die mütterliche und die väterliche Erbanlage einer diploiden Zelle getrennt in Plasmid-Vektoren eingebracht. Sequenziert man nun das Produkt einer Vektor-Kolonie, erhält man genau eine Forward- und eine Reverse-Sequenz von entweder mütterlicher oder väterlicher DNA.

2.5.6 Genotypisierung der Punktmutation c.1169T>G (p.Met390Arg) in Exon 12 in *BBS1*

Die Aminosäuresubstitution von Methionin (Met) durch Arginin (Arg) an Stelle 390 in dem von *BBS1* kodierten Protein entwickelt sich aus der Punktmutation c.1169T>G, einem Basenaustausch von Thymin (T) durch Guanin (G) an Position 1169 der cDNA (NM_024649.4). Zur Genotypisierung der häufig auftretende Mutation p.Met390Arg in *BBS1* ist ein Enzymverdau mit der Restriktionsendonuklease *AvaII* etabliert worden, sodass keine aufwändige Sequenzierung nötig ist (Frick 2007).

Dafür wurde das Exon 12 gemeinsam mit seinen flankierenden Bereichen in der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der Länge 300 bp in eine Restriktionsspaltung eingesetzt. Die Punktmutation 1169G führt im PCR-Produkt mit den Primern Exon12-89f und Exon12-388r zu einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AvaII* (Abb. 2.5-4). Durch gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauprodukte (104 bp und 196 bp) ist eine Genotypisierung möglich (Abb. 2.5-5).

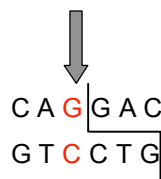


Abbildung 2.5-4: Darstellung der Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *AvaII*.

Bei dem Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) entsteht eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *AvaII*. Der Pfeil zeigt die Stelle des Basenaustausches (Position 1669) an. Abkürzungen: G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T=Thymin.

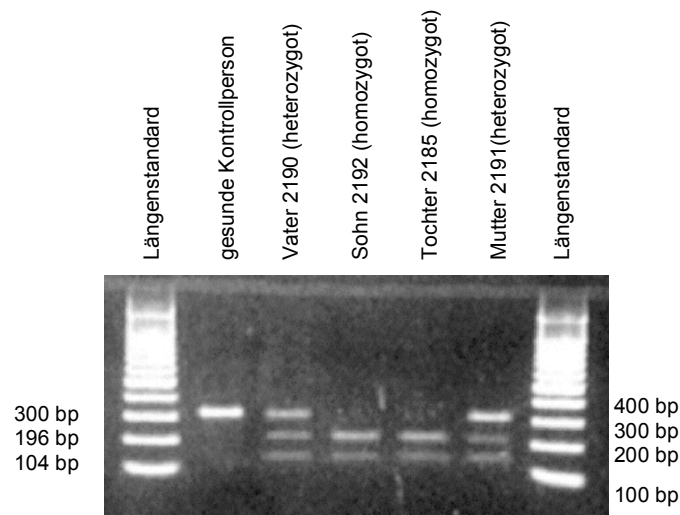


Abbildung 2.5-5: Ergebnis der Restriktionsspaltnung der DNA-Proben der Familie 2034 mit *AvaII* zur Mutationssuche in Exon 12 (Agarosegel 2%).

Gesunde zeigen nur das 300 bp lange Fragment. Heterozygote Träger der Mutation (Vater und Mutter) zeigen drei Fragmente mit den Längen 300 bp, 196 bp und 104 bp. Homozygote Träger der Mutation (Patient und seine betroffene Schwester) zeigen zwei Fragmente mit den Längen 196 bp und 104 bp.

3 Probanden

In der vorliegenden Studie wurden Blutproben von 76 Patienten mit dem Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) untersucht. Die Proben wurden von Kliniken, niedergelassenen Ärzten und der Selbsthilfegruppe „Pro Retina“ an das Zentrum für Humangenetik in Marburg gesandt. Die Diagnose BBS wurde bei den Patienten durch den behandelnden Arzt anhand des klinischen Kriterienkataloges gestellt, der von Beales und Mitarbeitern im Jahr 1999 aufgestellt wurde (Beales et al. 1999). Vier von sechs Hauptkriterien oder drei Haupt- und zwei Nebenkriterien müssen für die klinische Diagnose BBS vorhanden sein (Tab. 1.3-1).

Alle Patienten und Familienangehörigen wurden über die Intention der Studie mit einem Informationsblatt aufgeklärt und ausschließlich nach einer Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen. Der Studienaufbau wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg überprüft und anerkannt.

In einigen Fällen waren neben den Blutproben von BBS-Patienten auch Blutproben von Familienangehörigen vorhanden. In zehn solcher Familien sind mehrere Mitglieder von BBS betroffen. Bei neun dieser Familien handelte es sich um zwei erkrankte Geschwisterkinder. In einer Familie sind drei Geschwisterkinder betroffen. In solchen Fällen wurde nur ein Betroffener pro Familie als Indexpatient für die Untersuchung ausgewählt.

Tabelle 3-1 präsentiert eine detaillierte Aufschlüsselung der Probanden. Die Gruppe der 87 an BBS erkrankten Personen setzt sich aus 76 Patienten und 11 betroffenen Geschwistern zusammen. Die Gesamtzahl der gesunden Familienangehörigen umfasst insgesamt 137 Personen. Es sind keine an BBS erkrankten Eltern in der Studiengruppe.

Tabelle 3-1: Aufschlüsselung der Probanden

Probanden	Klinische Diagnose	Anzahl
Patienten	BBS	76
Geschwister	BBS	11
Geschwister	gesund	41
Väter	gesund	45
Mütter	gesund	47
Großeltern	gesund	4

Die Patienten stammen aus verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Die Mehrzahl ist mit einem Anteil von 71,1% (54/76) deutscher Herkunft. Von den übrigen Patienten stammen 17,1% (13/76) aus der Türkei und 11,8% (9/76) sind anderer ausländischer Herkunft (Tab. 3-2). In acht Patienten-Familien sind die Eltern miteinander verwandt. Dabei es handelt sich, mit Ausnahme einer rumänischen und einer deutschen Familie, ausschließlich um Familien türkischer Abstammung.

Tabelle 3-2: Herkunft der Patienten

Herkunft	Anzahl der Patienten
Deutschland	54
Türkei	13
Australien	2
Kanada	1
Arabische Emirate	1
Brasilien	1
Bosnien	1
Rumänien	1
Italien	1
Niederlande	1
gesamt	76

Es wurde nur bei 75 von 76 Patienten die p.Met390Arg-Genotypisierung im Exon 12 von *BBS1* durchgeführt. Eine Patientin türkischer Herkunft konnte nicht berücksichtigt werden, weil bei ihr eine Deletion der Exons 12-13 vorliegt (c.Ex12_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). In die SSCA des *BBS1*-Gens konnten nur 72 von 76 Patienten eingeschlossen werden. Die Blutproben einer deutschen Patientin und dreier Patienten anderer, jedoch nicht-türkischer, Herkunft trafen erst ein, als die SSCA von *BBS1* bereits abgeschlossen war. Das Exon 2 in *BBS10* wurde dagegen bei allen 76 Patienten analysiert (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: Aufgliederung der 76 Patienten nach der jeweilig durchgeführten Untersuchung

Gen	Untersuchung	Anzahl der analysierten Patienten	Herkunft
BBS1	Genotypisierung von p.Met390Arg in <i>BBS1</i>	75	54 Deutschland 12 Türkei 9 andere
	SSCA von zehn Exons in <i>BBS1</i>	72	53 Deutschland 13 Türkei 6 andere
BBS10	Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5 in <i>BBS10</i>	76	54 Deutschland
	Sequenzierung von Exon 2 in <i>BBS10</i>		13 Türkei
			9 andere

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse von *BBS1*

Das *BBS1*-Gen (Abb. 4.1-1) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert (11q13). Es hat für das Bardet-Biedl-Syndrom besondere Bedeutung, da es am häufigsten bei BBS-Kranken verändert ist. Fast bei jedem vierten Betroffenen (23,2%) können Sequenzvariationen in diesem Genlocus gefunden werden (Katsanis 2004).

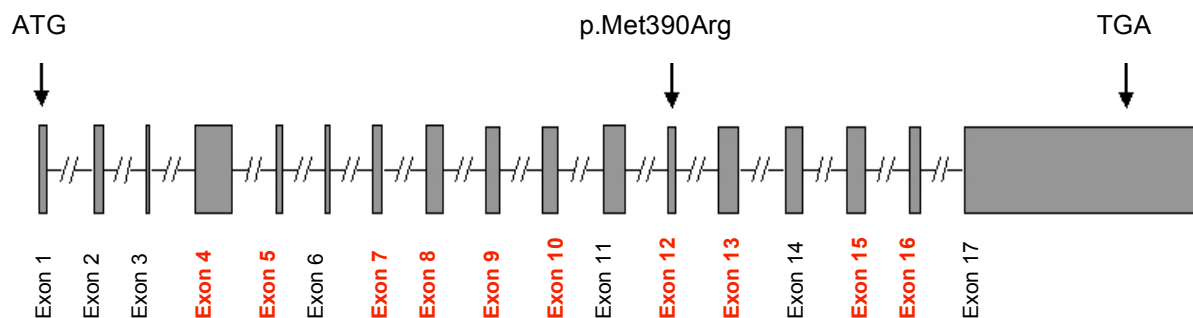


Abbildung 4.1-1: Genstruktur von *BBS1* (Mykytyn et al. 2002)

Die Rechtecke stellen die 17 Exons dar. Im Rahmen dieser Studie untersuchte Exons sind fett gedruckt und rot markiert.

Das Startkodon ATG liegt im Exon 1, das Stoppkodon TGA im Exon 17. Die häufigste Mutation p.Met390Arg liegt im Exon 12.

Die Mutation p.Met390Arg im Exon 12 von *BBS1* wird in der internationalen Literatur bei 18,1% der BBS-Patienten gefunden (Beales et al. 2003). Wegen ihrer großen Bedeutung werden daher die Ergebnisse zur Mutationsanalyse von p.Met390Arg zuerst dargestellt. Anschließend folgt die Vorstellung der übrigen Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse von *BBS1*.

4.1.1 Mutationsanalyse für c.1169T>G, Exon 12 (p.Met390Arg)

Die häufigste *BBS1*-Mutation p.Met390Arg liegt im Exon 12. Die Umwandlung der Aminosäure Methionin zu Arginin an Position 390 des BBS1-Proteins (p.Met390Arg) wird hervorgerufen durch einen Basenaustausch von Thymin durch Guanin an der Position 1169 der cDNA (c.1169T>G).

Zur Genotypisierung von p.Met390Arg wurde bei 75/76 Patienten ein *AvaII*-Enzymverdau durchgeführt. Eine Patientin türkischer Herkunft konnte nicht berücksichtigt werden, da sie homozygote Trägerin einer Deletion der Exons 12-13 ist (c.Ex12_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). In Tabelle 4.1-1 sind die 75 Patienten ihrer Herkunft nach aufgegliedert.

Tabelle 4.1-1: Aufgliederung der 75 Patienten, bei denen eine Genotypisierung von p.Met390Arg durchgeführt wurde.

Gen	Untersuchung	Anzahl der analysierten Patienten	Herkunft
BBS1	Genotypisierung von p.Met390Arg in <i>BBS1</i>	75	54 Deutschland 12 Türkei 9 andere

Von den analysierten Patienten tragen 89,3% (67/75) den homozygoten Wildtyp (WT/WT), 2,7% (2/75) sind heterozygote Träger der Mutation (WT/p.Met390Arg) und 8,0% (6/75) tragen die Mutation im homozygoten Genstatus (p.Met390Arg/p.Met390Arg) (Tab. 4.1-2). Alle Mutationsträger sind deutscher Herkunft (54/75), sodass bei 14,8% (8/54) der deutschen Patienten die Punktmutation p.Met390Arg vorliegt, bei 3,7% (2/54) in heterozygoter und bei 11,1% (6/54) in homozygoter Form. Die 12 türkischen Patienten und die neun Patienten anderer als deutscher oder türkischer Herkunft (21/75) sind alle Träger des homozygoten Wildtyps in diesem Sequenzbereich (WT/WT). Für die gesamte Studienpopulation liegt die Allelfrequenz für das mutante Allel p.Met390Arg bei 9,3% (Tab. 4.1-2).

Tabelle 4.1-2: Ergebnisse der Genotypisierung von p.Met390Arg bei 75 Patienten

Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
WT/WT	67/75	89,3%	89,3%
WT/p.Met390Arg	2/75	2,7%	9,3%
p.Met390Arg/p.Met390Arg	6/75	8,0%	

WT=Wildtyp-Allel, p.Met390Arg=mutantes Allel

Die phänotypische Merkmalsausprägung bei den acht Mutationsträgern wird in Tabelle 4.1-3 dargestellt. Bei sieben dieser acht Patienten sind mindestens drei von sechs Hauptmerkmalen vorhanden. Eine Patientin der homozygoten Mutationsträger weist keine Adipositas auf, bietet aber ansonsten eine typische Symptomatik.

Die homozygote Trägerin einer Deletion der Exons 12-13 (c.Ex12_Ex13del), bei der keine Genotypisierung von p.Met390Arg stattfinden konnte, weist eine postaxiale Polydaktylie, Adipositas, ein vermindertes Sehvermögen und Nierenfehlbildungen auf. Neben diesen drei Hauptmerkmalen des BBS bietet sie außerdem mit einem Sinus urogenitalis und einem Vorhofseptumdefekt typische Merkmale des McKusick-Kaufman Syndroms (MKKS) (Oeffner et al. 2003).

Tabelle 4.1-3: Gegenüberstellung des p.Met390Arg-Genotyps und des BBS-Phänotyps

Patient	Genotyp	Polydaktylie	Adipositas	Retinitis pigmentosa
2144	WT/p.Met390Arg	✓	✓	✓
2160	WT/p.Met390Arg	✓	✓	✓
2060	p.Met390Arg/p.Met390Arg	✓	✓	✓
2135	p.Met390Arg/p.Met390Arg	✓	✓	✓
2168	p.Met390Arg/p.Met390Arg	✓	—	✓
2170	p.Met390Arg/p.Met390Arg	✓	✓	✓
2185	p.Met390Arg/p.Met390Arg	✓	✓	✓
2206	p.Met390Arg/p.Met390Arg	✓	✓	✓

WT=Wildtyp-Allel, p.Met390Arg=mutantes Allel, ✓ = Merkmal vorhanden, — = Merkmal fehlt

4.1.2 SSCA und Sequenzanalyse in *BBS1*

Bei 72/76 Patienten liegen SSCA-Ergebnisse zu 10 von 17 Exons des *BBS1*-Gens vor. Vier der 76 Patienten konnten nicht in die SSCA mit eingeschlossen werden, da ihre Blutproben erst eintrafen als diese Untersuchung bereits abgeschlossen war. Die 72 analysierten Patienten werden in Tabelle 4.1-4 ihrer Herkunft nach aufgegliedert.

Die Exons 1, 2, 3, 6, 11, 14 und 17 mussten aus der Studie entfallen, da sie Schwierigkeiten bei der PCR-Amplifikation boten (Tab. 2.3-1, 2.3-2 und 2.3-3). Die Tabelle 4.1-5 listet die mittels SSCA getesteten Exons auf. Exon 4 wurde wegen seiner Größe von 273bp in zwei überlappende Fragmente (4a und 4b) aufgeteilt, da das Exon in seiner vollen Länge für die SSCA zu groß ist.

Tabelle 4.1-4: Aufgliederung der 72 Patienten, bei denen eine SSCA von zehn Exons in *BBS1* durchgeführt wurde.

Gen	Untersuchung	Anzahl der analysierten Patienten	Herkunft
<i>BBS1</i>	SSCA von 10 Exons in <i>BBS1</i>	72	53 Deutschland 13 Türkei 6 andere

Tabelle 4.1-5: Analyisierte Exons in *BBS1* und ihre Lokalisation in der cDNA-Sequenz (NM_024649.4)

Exon	Größe in bp	Lokalisation in cDNA-Sequenz NM_024649.4
4 Exon 4a Exon 4b	273	c.160_338 c.221_432
5	47	c.433_479
7	73	c.519_591
8	132	c.592_723
9	107	c.724_830
10	121	c.831_1110
12	70	c.1111_1180
13	159	c.1181_1339
15	135	c.1474_1608
16	87	c.1609_1695

Die SSCA-Muster der DNA-Fragmente wurden in Varianten eingeteilt. Das häufigste Muster wurde als Variante 1 bezeichnet, das zweithäufigste als Variante 2. Ein noch seltener auftretendes Fragmentmuster wurde einer Variante 3 zugeteilt. Zur Aufklärung des dazugehörigen Genotyps wurden PCR-Produkte, die in der SSCA ein auffälliges Fragmentmuster lieferten, sequenziert.

So konnte geklärt werden, ob im Vergleich zur Referenzsequenz des Wildtyps (NM_024649.4) Veränderungen in der Sequenz der Patienten-DNA vorliegen. Die Benennung der Mutationen erfolgt nach der gängigen Nomenklatur (den Dunnen and Antonarakis 2000).

Es wurden die Analysen einer vorausgegangenen experimentellen Arbeit zum Bardet-Biedl-Syndrom mitberücksichtigt (Meyer 2008).

4.1.2.1 Exon 4a, Primerkombination Ex4a - 145f / 387r

Das SSCA-Fragmentmuster für die PCR-Produkte von Exon 4a war bei allen Patienten unscharf und von Hintergrundsignalen überschattet. Bei 20°C ließ sich eine etwas klarere Fragmentauftrennung erzielen, jedoch waren auch hier zum Teil verstrichene Fragmente sichtbar. Wahrscheinlich ist dieses Phänomen auf ein unspezifisches Annealing der Primer in der PCR-Amplifizierung zurückzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte bei 27/72 Patienten eine SSCA des Exons 4a. Es fanden sich keine Auffälligkeiten im Laufverhalten der DNA-Fragmente, daher wurde bei keinem der 27 Patient eine Sequenzanalyse angeschlossen. Die übrigen 45/72 Patienten wurden im Rahmen der Arbeit von Meyer molekulargenetisch analysiert. Bei keinem Patienten konnten Sequenzveränderungen festgestellt werden (Meyer 2008).

Exemplarisch sind SSCA-Ergebnisse von 5 Patienten bei 10°C und 20°C dargestellt (Abb. 4.1-2 und 4.1-3).

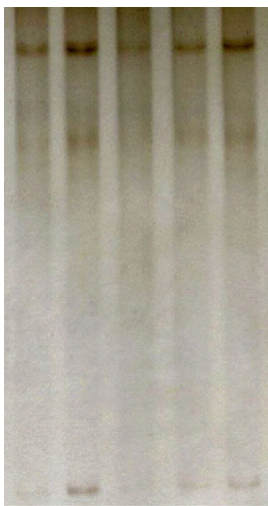


Abbildung 4.1-2:
SSCA 38, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 4a



Abbildung 4.1-3:
SSCA 40, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 4a

4.1.2.2 Exon 4b, Primerkombination Ex4b - 270f/508r

Es konnten bei 27/72 getesteten Patienten unter beiden Temperaturbedingungen zwei verschiedene Einzelstrang-Konformationen beobachtet werden. Dabei entsprachen 17/27 Fälle einem Fragmentmuster der Variante 1, die restlichen 10/27 Patienten-DNA-Fragmente zeigten ein Variante 2-Muster. Die Abbildungen 4.1-4 und 4.1-5 zeigen Beispiele für die Einzelstrang-Konformationen des Exons 4b anhand der SSCA von zwei Familien (Familie 2058, Familie 2076).

In der Sequenzanalyse wurden jeweils 2 DNA-Proben der SSCA-Variante 1 und der SSCA-Variante 2 analysiert. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 4.1-6 zusammengefasst.

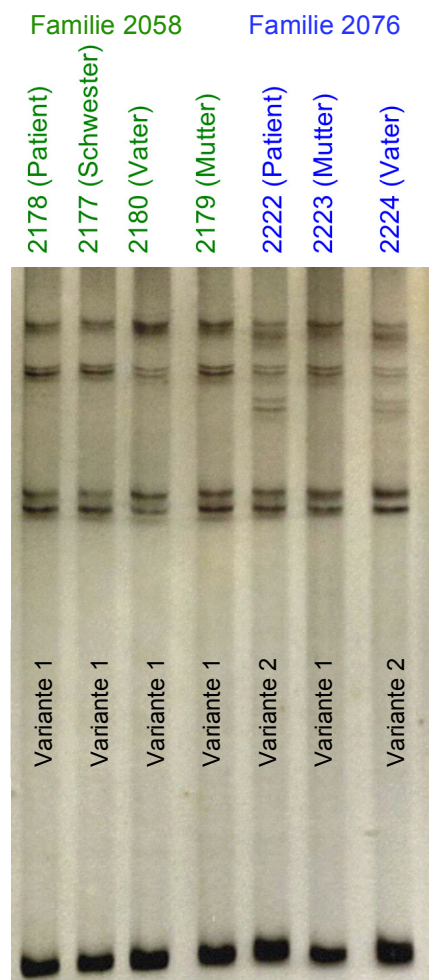


Abbildung 4.1-4:
SSCA 71, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 4b

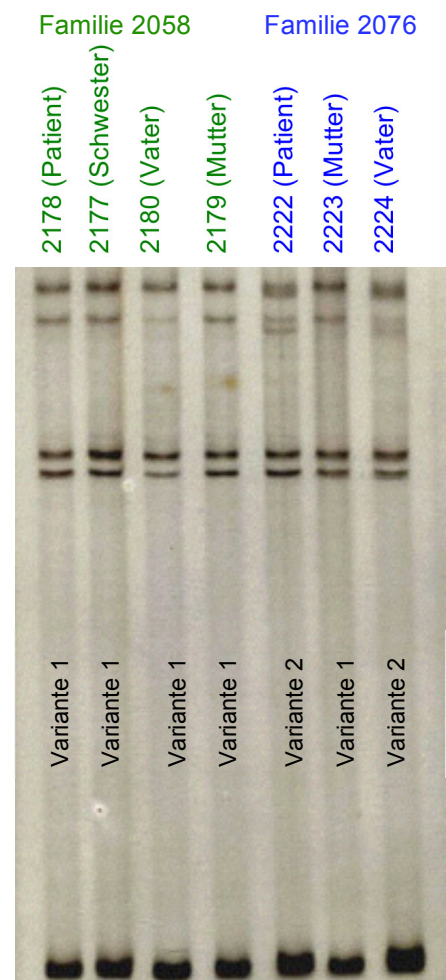


Abbildung 4.1-5:
SSCA 73, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 4b

Tabelle 4.1-6: Ergebnisse der Sequenzanalyse im Exon 4b

DNA-Nummer	SSCA-Auffälligkeit	cDNA-Sequenzvariation
2178	Variante 1	Wildtyp
2213	Variante 1	Wildtyp
2220	Variante 2	c.378G>A (heterozygot)
2237	Variante 2	c.378G>A (heterozygot)

Dem Variante 1-Muster liegt in beiden Fällen der homozygote Wildtyp zugrunde (Genotyp: G/G). Das Variante 2-Muster entspricht übereinstimmend einem heterozygoten Genstatus mit der Sequenzveränderung c.378G>A auf einem Allel (Genotyp: G/A). Dabei besteht an Stelle 378 der cDNA des *BBS1*-Gens eine Basensubstitution von Guanin durch Adenin.

Für das BBS1-Protein hat dieser Basenaustausch keine Konsequenzen, denn c.378G>A bewirkt eine synonyme oder auch stille Mutation p.Leu126Leu. Es handelt sich bei c.378G um die „wobble“-Base an dritter Stelle im kodierenden Triplet eines Leucins und bei der Umwandlung des Triplets von CTG in CTA kommt es zu keiner Aminosäuresubstitution. Die synonyme Mutation c.378G>A (p.=Leu126Leu) wurde bereits in der Literatur beschrieben (Karmous-Benailly et al. 2005).

Die Abbildungen 4.1-6 und 4.1-7 stellen die Ergebnisse der Sequenzanalysen einer DNA-Probe mit Variante 1- und einer mit Variante 2- Muster dar.

Abbildung 4.1-6:

Homozygoter Wildtyp (Patient 2178)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2178, die in der SSCA ein Variante 1-Muster ergab.

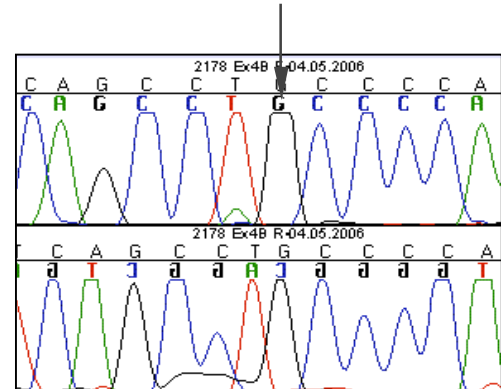
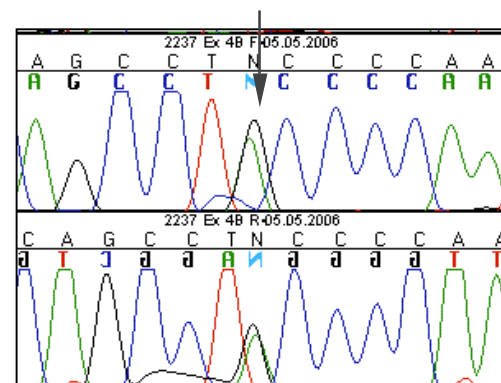


Abbildung 4.1-7:

Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung c.378G>A im Exon 4b (Patient 2237)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2237, die in der SSCA ein Variante 2-Muster ergab. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.378G>A.



Die Heterozygotie für c.378G>A(p.=Leu126Leu) kann die unterschiedlichen SSCA-Ergebnisse in den Familien erklären. In Familie 2076 trägt der Vater die Mutation c.378G>A(p.= Leu126Leu) auf einem Chromosom (Genotyp: G/A, SSCA: Variante2-Muster), die Mutter besitzt zwei Chromosomen des Wildtyps (Genotyp: G/G, SSCA: Variante 1-Muster). Dem Kind wurde von seinem Vater das veränderte Chromosom (A) und von seiner Mutter das Wildtyp-Chromosom (G) vererbt, sodass wieder ein heterozygoter Genstatus mit der Mutation c.378G>A(p.=Leu126Leu) vorliegt (Genotyp: G/A, SSCA: Variante2-Muster).

In der Arbeit von Meyer konnte für einige Patienten die gleiche Sequenzvariante gefunden werden (Meyer 2008). In der SSCA waren ebenfalls zwei differenzierbare Laufverhalten der DNA-Fragmente zu beobachten und die Sequenzierung ausgewählter Proben wies ebenso den heterozygoten Genstatus des Polymorphismus c.378G>A(p.=Leu126Leu) auf. Nur ein Patient (2125) konnte in der SSCA keinem der beiden beschriebenen Fragmentmuster zugeordnet werden (Abb. 4.1-8). Eine Sequenzierung wurde bisher nicht durchgeführt. Das SSCA-Ergebnis deutete aber darauf hin, dass hier ein homozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung c.378G>A(p.=Leu126Leu) auf beiden Allelen vorliegen könnte (Genotyp: A/A). Die Banden des mutierten Allels A (Adenin) sind im Fragmentmuster mit roten Pfeilen, die Banden des Wildtyp-Allels G (Guanin) mit grünen Pfeilen markiert.

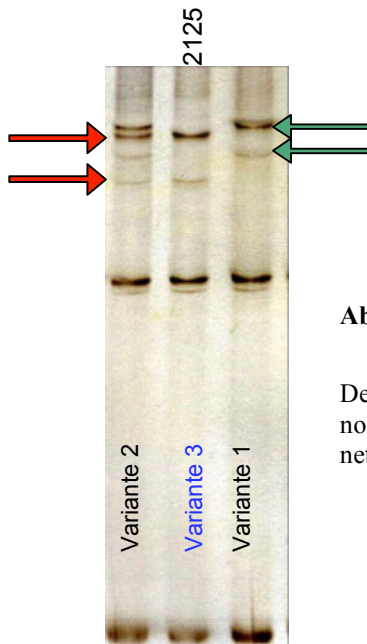


Abbildung 4.1-8: Patient 2125 in der SSCA 43, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 4b (Meyer 2008)

Der Patient 2125, entspricht in seiner Fragmentauftrennung weder der Variante 1 noch der Variante 2, deshalb wurde sein Fragmentmuster einer Variante 3 zugeordnet.

Zusammenfassend zeigte sich dieser Polymorphismus bei 38,9% (28/72) der Patienten. Davon sind 27 Patienten (27/72, 37,5%) Träger des heterozygoten Genstatus des Polymorphismus (Genotyp: G/A) und ein Patient (1/72) ist homozygoter Mutationsträger (Genotyp: A/A). Die restlichen 44 Patienten (44/72; 61,1%) tragen den homozygoten Genotyp des Wildtyps von Exon 4b (Genotyp: G/G).

Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz von 20,1% für den Polymorphismus c.378G>A(p.=Leu126Leu). Klinisch lässt sich bei den Trägern des Polymorphismus c.378G>A(p.=Leu126Leu) kein signifikanter Unterschied zu anderen BBS-Patienten feststellen. Auch der Patient mit homozygotem Genstatus von c.378G>A(p.=Leu126Leu) weist keine stärker ausgeprägte Symptomatik auf.

4.1.2.3 Exon 5, Primerkombination Ex5 f / r

Die SSCA zeigte ein sehr polymorphes Bild und es fiel schwer, bestimmte Laufmuster voneinander zu differenzieren. Durch etliche undeutliche Zusatzbanden wiesen die Fragmentmuster jeder DNA-Probe feine Unterschiede auf.

In der vorliegenden Arbeit wurden 5 der 27 untersuchten Patienten sowie ein gesunder Familienangehöriger ausgewählt und sequenziert. Die Bandenmuster der DNA-Fragmente von drei Patienten werden in Abbildungen 4.1-9 und 4.1-10 präsentiert. Es wurde bei keiner der 6 Proben eine Veränderung in der genomischen Sequenz festgestellt.

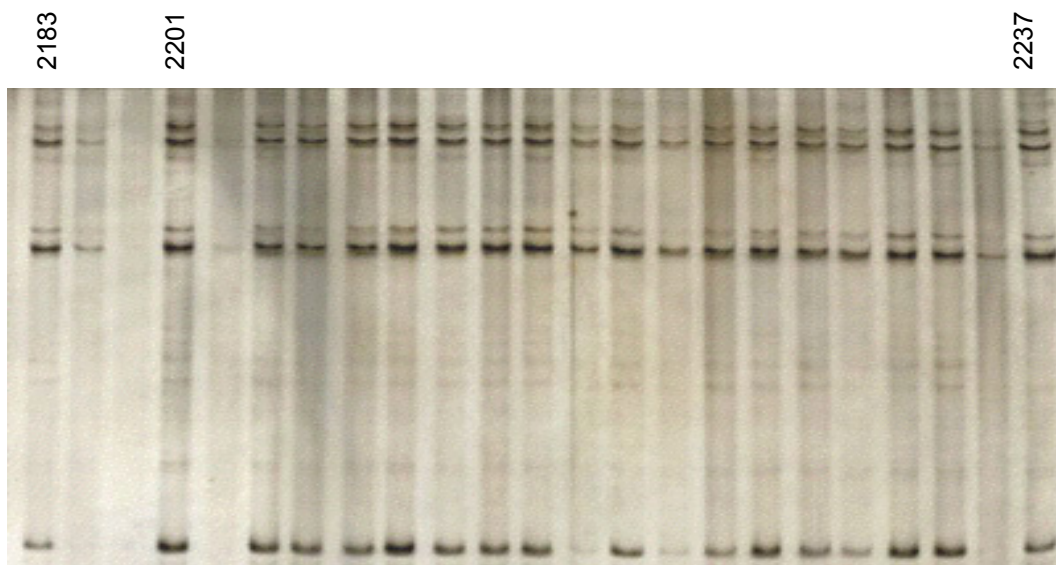


Abbildung 4.1-9: SSCA 69, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 5

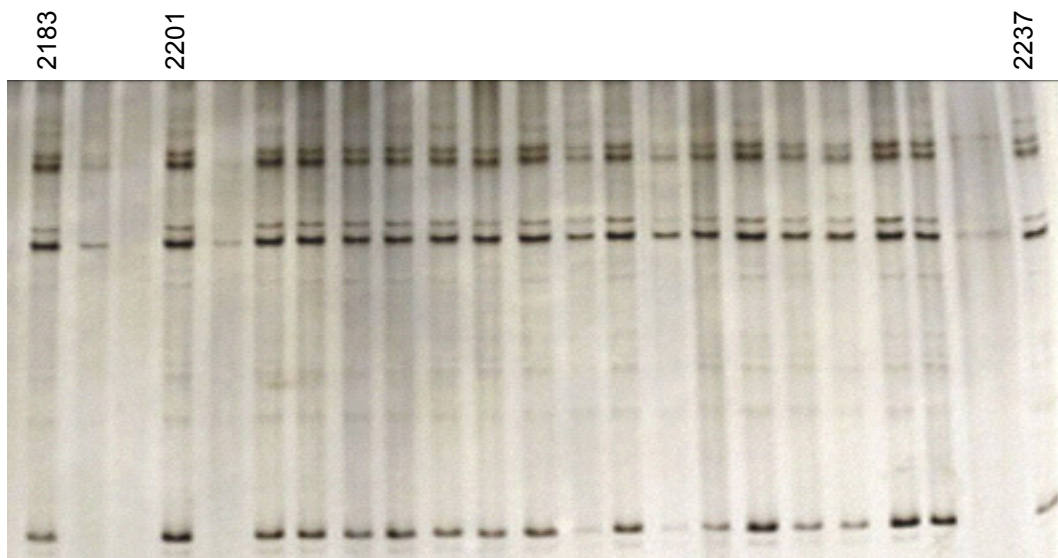


Abbildung 4.1-10: SSCA 70, PAA-Gel 12%, 20°C; Exon 5

In der Arbeit von Meyer wird ein Patient (2105) vorgestellt, bei dem nach Sequenzierung des Exons 5 die Intronvariation c.479+31_32insC bei heterozygotem Genstatus nachgewiesen wurde (Meyer 2008). Es handelt sich hierbei um eine Insertion der Base Cystein 31 bp hinter dem Exon im Intron 5 (Referenzsequenz: AF 503941). Diese Intronvariante hat voraussichtlich keine Bedeutung für das BBS1-Protein, da sie weit vom Exon entfernt und außerhalb der Spleiß-Site liegt. Zu dem Patienten 2105 liegt kein klinischer Befund vor. Da die Diagnose nach festgelegten Kriterien gestellt wurde, weist er vermutlich mindestens drei klinische Hauptkriterien auf (Tab. 1.3-1).

4.1.2.4 Exon 7, Primerkombination BBS1-Ex7-2005-F/R

Es konnten in der SSCA des Exons 7 erneut zwei Gruppen von Fragmentmustern unterschieden werden. Bei 10°C war eine Differenzierung der beiden Fragmentmuster immer möglich, während bei 20°C meist kein Unterschied zu erkennen war.

Von 72 getesteten DNA-Proben zeigten 43 (43/72) ein Variante 1- und 27 (27/72) ein Variante 2-Muster. Zwei Proben (2125 und 2236) konnten keinem dieser beiden Muster zugeordnet werden, ihr Fragmentmuster wurde Variante 3 genannt (2/72).

Im Muster der Variante 3 war im Vergleich zu den häufigeren Fragmentmustern bei der 10°C-SSCA eine Bande weniger vorhanden (markiert durch einen grünen Pfeil in Abbildung 4.1-11). Der Patient 2125 war schon in der SSCA des Exons 4b auffällig gewesen und dem Fragmentmuster des Exons 4b nach zu urteilen lag hier der homozygote Genotyp mit dem Polymorphismus c.378G>A(p.=Leu126Leu) vor (Abb. 4.1-8) (Meyer 2008). Zu dem Probanden 2236 liegen keine weiteren Ergebnisse vor, da er nicht zur Gruppe der Patienten dieser Studie gezählt wurde. Es handelt sich um den von BBS betroffenen Bruder der Indexpatientin 2237 (Variante 2) und die Observation seines SSCA-Ergebnisses war ein Zufallsbefund.

Ein anderer Patient (2213) präsentierte einmalig in der SSCA unter beiden Temperaturbedingungen ein nicht reproduzierbares Fragmentmuster, das nur unklar als Variante 1 interpretiert werden konnte. Bei wiederholter SSCA-Durchführung zeigte er ein klares Variante 1-Muster (Abb. 4.1-13).

In Abbildungen 4.1-11 und 4.1-12 werden die Bandenmuster der Variante 1 und der Variante 2 dargestellt. Ebenso zu sehen sind die aufgetrennten DNA-Fragmente der beiden auffälligen Patienten 2125 und 2236. Abbildung 4.1-13 präsentiert die SSCA der DNA-Fragmente des Patienten 2213.

Interessanterweise fand sich insgesamt die gleiche Verteilung der DNA-Proben auf die beiden Fragmentmuster Variante 1 und -2, wie im Exon 4b. Hierzu können die SSCA-Gele der Familien 2058 und 2076 direkt miteinander verglichen werden (Abb. 4.1-4 und 4.1-5).

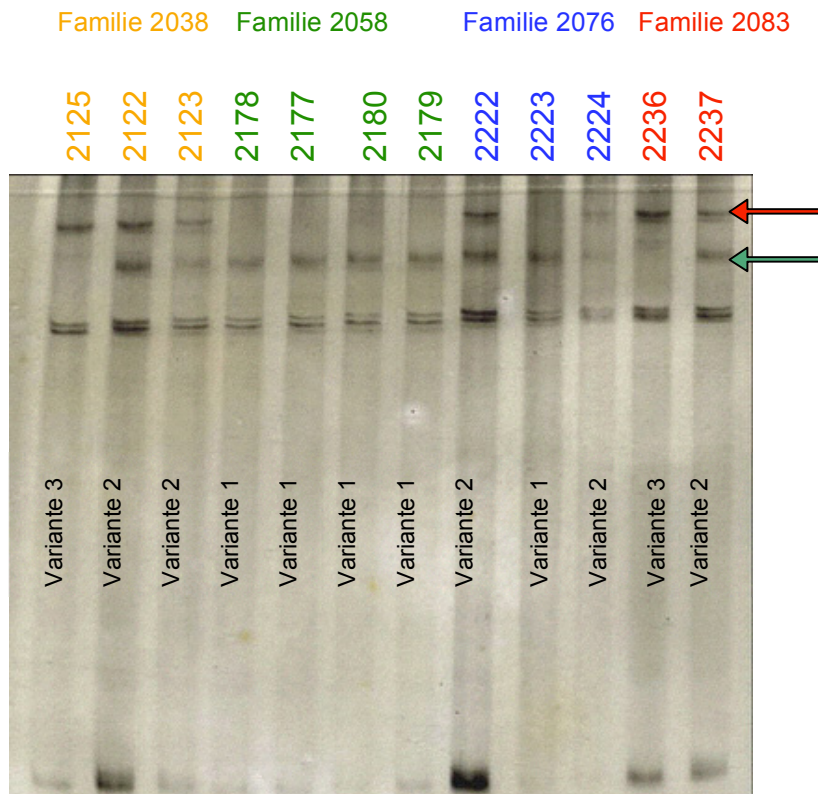


Abbildung 4.1-11: SSCA 71 , PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 7

Der grüne Pfeil markiert die charakteristische Bande der Variante 1, der rote Pfeil die der Variante 2.

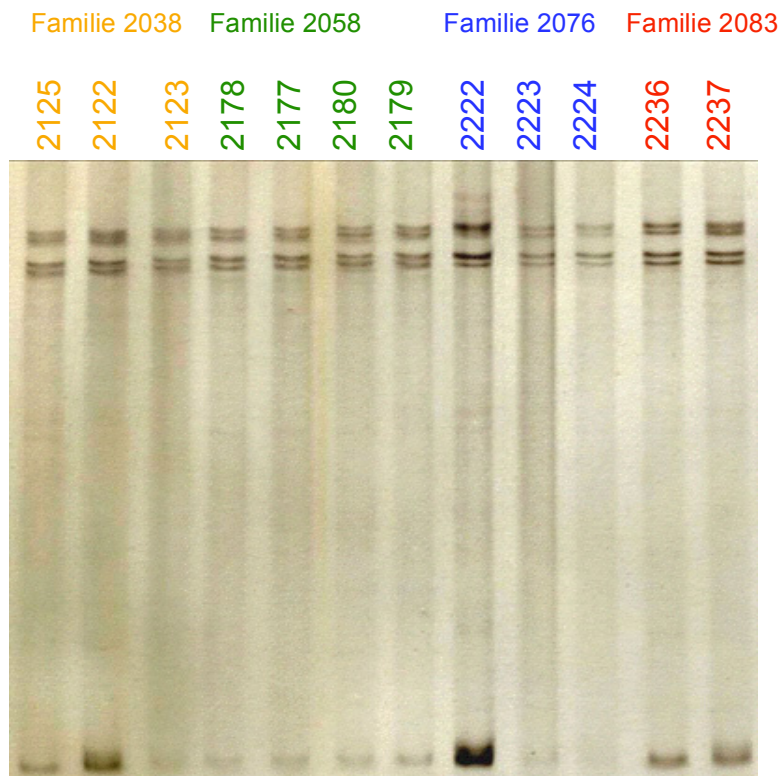


Abbildung 4.1-12: SSCA 73, PAA-Gel 12%, 20°C Exon 7

Hier sind keine Unterschiede im Laufverhalten der DNA-Fragmente sichtbar.

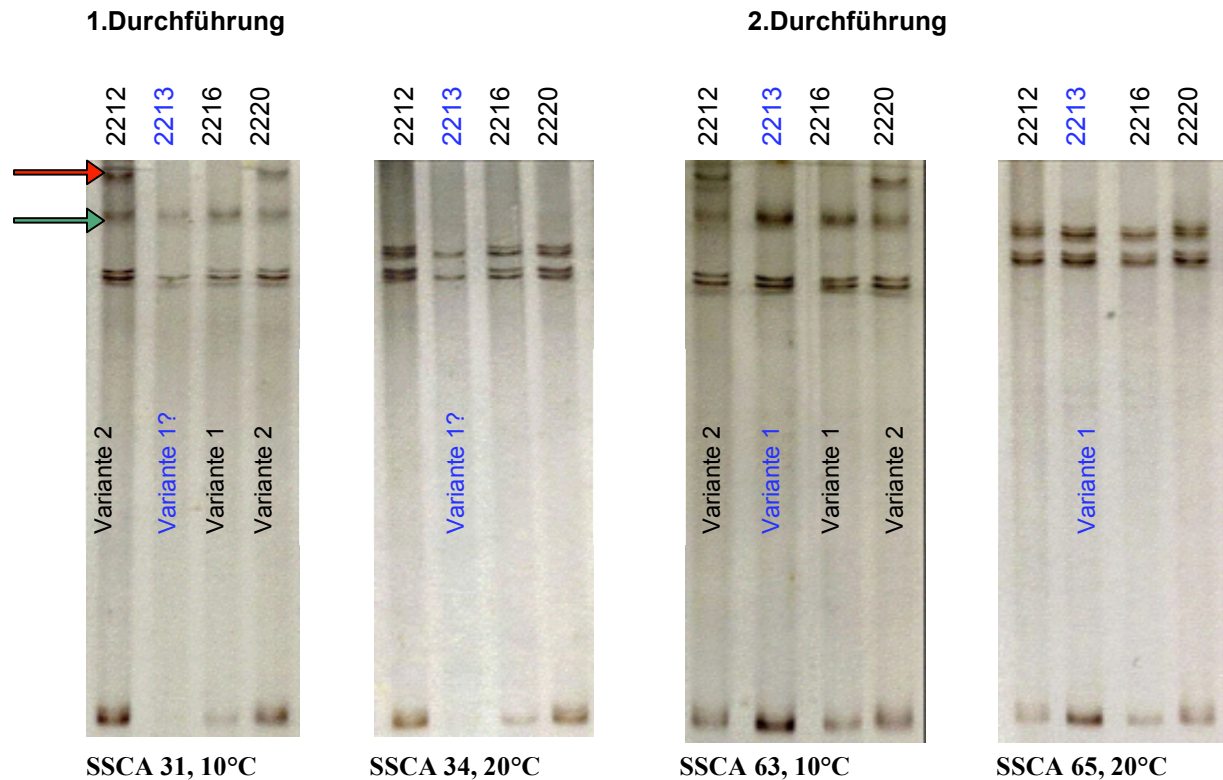


Abbildung 4.1-13: SSCA mit der DNA-Probe des Patienten 2213 im Exon 7, PAA-Gel 12%

Das einmalig auffällige SSCA-Ergebnis von 2213, lässt sich nicht reproduzieren. Bei der zweiten SSCA-Durchführung zeigt 2213 ein unauffälliges Variante 1-Muster.

Es wurden sechs PCR-Produkte sequenziert. Ein Patient mit einem Variante 1- und ein Patient mit einem Variante 2-Fragmentmuster (2178 und 2220) sowie die auffälligen Proben 2125, 2236 und 2213 (Tab. 4.1-7). Die DNA der Patientin 2237, die ein Variante 2-Muster in der SSCA zeigte, wurde zum Vergleich des Geschwisterpaares 2236 und 2237 ebenfalls sequenziert (Abb. 4.1-17 und 4.1-18).

Tabelle 4.1-7: Ergebnisse der Sequenzanalyse im Exon 7

DNA-Nummer	SSCA-Auffälligkeit	cDNA-Sequenzvariation
2178	Variante 1	Wildtyp
2220	Variante 2	c.519-75C>T (heterozygot)
2213	Variante 1?	Wildtyp
2125	Variante 3	c.519-75C>T (homozygot)
2236 (Familienmitglied)	Variante 3	c.519-75C>T (homozygot)
2237	Variante 2	c.519-75C>T (heterozygot)

Das Variante 1 entspricht, wie im Exon 4b, dem homozygoten Wildtyp (Genotyp: C/C), während das Variante 2-Muster in Verbindung mit dem heterozygoten Genstatus der Sequenzvariante c.519-75C>T steht (Genotyp: C/T). Hier ist 75 bp vor dem Exon 7 im Intron 6 die Base Cytosin durch die Base Thymin ersetzt. Bei den Patienten 2125 und

2236 mit einem Fragmentmuster der Variante 3 liegt die homozygote Form der Intronvariation c.519-75C>T vor (Genotyp: T/T) (Abb. 4.1-14 – 4.1-18).

Bei der DNA-Probe des Patienten 2213 handelt sich um den homozygoten Genstatus der Wildtypsequenz (Abb. 4.1-19). Das auffällige SSCA-Muster muss als Artefakt gewertet werden, der am wahrscheinlichsten mit einer fehlerhaften Durchführung begründet werden kann.

Die Basensubstitution c.519-75C>T liegt im Intron 6, einem nicht codierenden Abschnitt der DNA. Sie ist 75bp vor dem Exon 7 sowie mehr als 20 bp hinter dem Exon 6 lokalisiert. Der Einfluss auf das Spleißen der hnRNA ist äußerst unwahrscheinlich, da der Basenaustausch außerhalb der Spleiß-Site liegt. So hat diese Sequenzveränderung voraussichtlich keine Auswirkungen auf das BBS1-Protein.

Abbildung 4.1-14:

Homozygoter Wildtyp (Patient 2178)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2178, die in der SSCA ein Variante 1-Muster ergab.

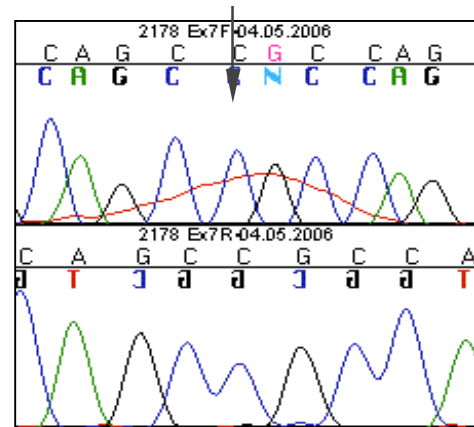


Abbildung 4.1-15:

Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzvariante c. 519-75C>T (Patient 2220)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2220, die in der SSCA ein Variante 2-Muster ergab. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.519-75C>T.

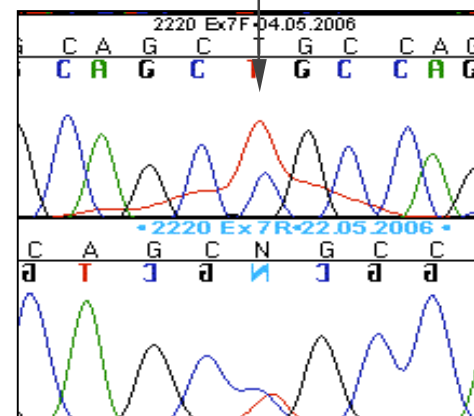


Abbildung 4.1-16:

Homozygoter Genotyp mit der Sequenzvariante c. 519-75C>T (Patient 2125)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2125, die in der SSCA ein Variante 3-Muster ergab. Auf beiden Allelen zeigt sich die Basensubstitution c.519-75C>T.

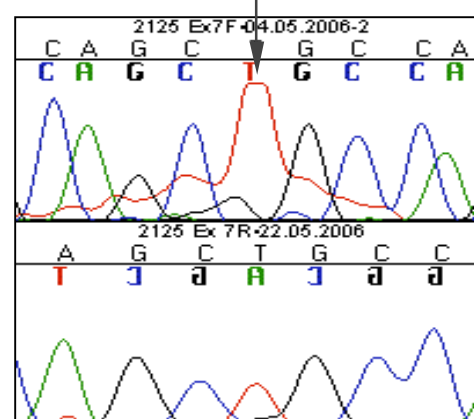
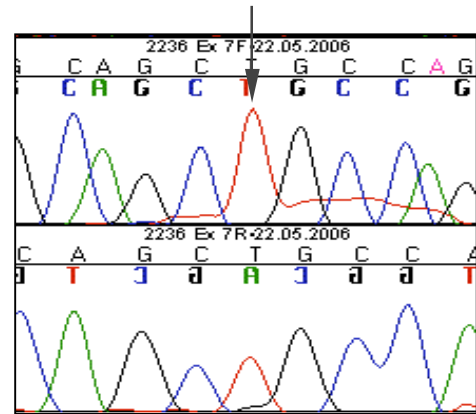


Abbildung 4.1-17:

**Homozygoter Genotyp mit der Sequenzvariante
c.519-75C>T**

**(DNA 2236, Bruder der Patientin 2237, Familie
2083)**

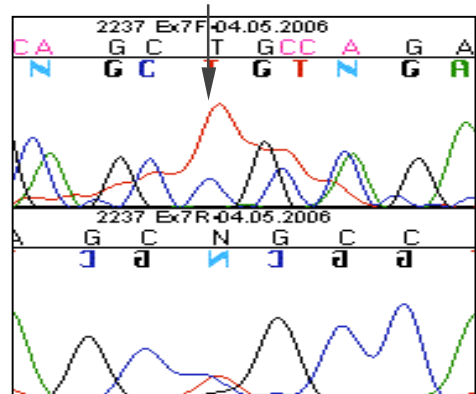
Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2236, die in der SSCA ein Variante 3-Muster ergab. Auf beiden Allelen zeigt sich die Basensubstitution c.519-75C>T.

**Abbildung 4.1-18:**

**Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzvariante
c.519-75C>T**

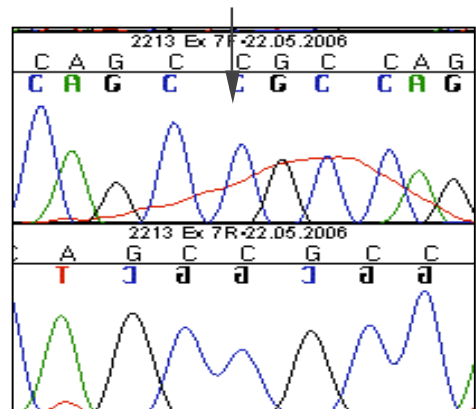
(Patientin 2237, Familie 2083)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2237, die in der SSCA ein Variante 2-Muster ergab. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.519-75C>T.

**Abbildung 4.1-19:**

Homozygoter Wildtyp (Patient 2213)

Forward und Reverse Sequenzierung der Probe 2213, die in der SSCA einmalig ein auffälliges Ergebnis lieferte, welches nicht zu reproduzieren war. Bei Wiederholungsversuchen ergab sich ein Variante 1-Muster.



Die Intronvariante zeigt sich bei denselben 28/72 analysierten Patienten (38,9%) wie der Polymorphismus c.378G>A(p.=Leu126Leu) im Exon 4b. Es sind 27 Patienten (27/72; 37,5%) heterozygote Träger beider Polymorphismen. Patient 2125, dessen Exon 4b nur in der SSCA interpretiert wurde, ist homozygoter Träger des Polymorphismus c.519-75C>T (Genotyp: T/T; 1/72 Patienten; 1,4%). Die restlichen 44 Patienten (44/72; 61,1%) tragen den homozygoten Wildtyp (Genotyp: C/C). Daraus ergibt sich mit 20,1% für den Polymorphismus c.519-75C>T im Intron 6 die gleiche Allelfrequenz wie für den Polymorphismus c.378G>A(p.=Leu126Leu) im Exon 4b.

Klinisch sind bei den Trägern der Polymorphismen c.378G>A(p.=Leu126Leu) und c.519-75C>T keine signifikanten Unterschiede zu den anderen BBS-Patienten festzustellen.

4.1.2.5 Exon 8, Primerkombination Ex8-102f/376r

Die 72 untersuchten DNA-Proben zeigten in der SSCA keine Auffälligkeit. Beispielhaft werden die Analysen von sechs der 72 Patienten unter beiden Temperaturbedingungen dargestellt (Abb. 4.1-20 und 4.1-21).

Bei 20°C war das SSCA-Ergebnis sehr viel besser auswertbar. Die 10°C PAA-Gele waren nur schwach angefärbt und auch nach Wiederholungsversuchen, zum Ausschluss methodischer Fehler, konnte keine deutlichere Darstellung bei 10°C erreicht werden.



Abbildung 4.1-20:
SSCA 72, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 8



Abbildung 4.1-21:
SSCA 74, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 8

4.1.2.6 Exon 9, Primerkombination BBS1-Ex9-2005-F/R

In der SSCA ließen sich zwei Laufvarianten der Fragmente unterscheiden. Von 72 Patienten zeigten 17 ein Fragmentmuster der Variante 2 mit einer dickeren Bande in der Doppelstrang-Konformation (17/72). Die dazugehörigen Einzelstrang-Konformationen wichen kaum von den Fragmentmustern der Variante 1 ab, es ließen sich aber bei genauer Beobachtung eine dickere Bande und eine leichte Verschiebung nach oben feststellen. In den dargestellten SSCA-Gelen sind die Variante 2-Muster mit einem schwarzen Pfeil markiert (Abb. 4.1-22 und 4.1-23). Es wurden 4 Proben sequenziert (2019, 2035, 2043 und 2060), sodass für beide Laufvarianten jeweils zwei Sequenzanalysen vorliegen (Tab. 4.1-8).

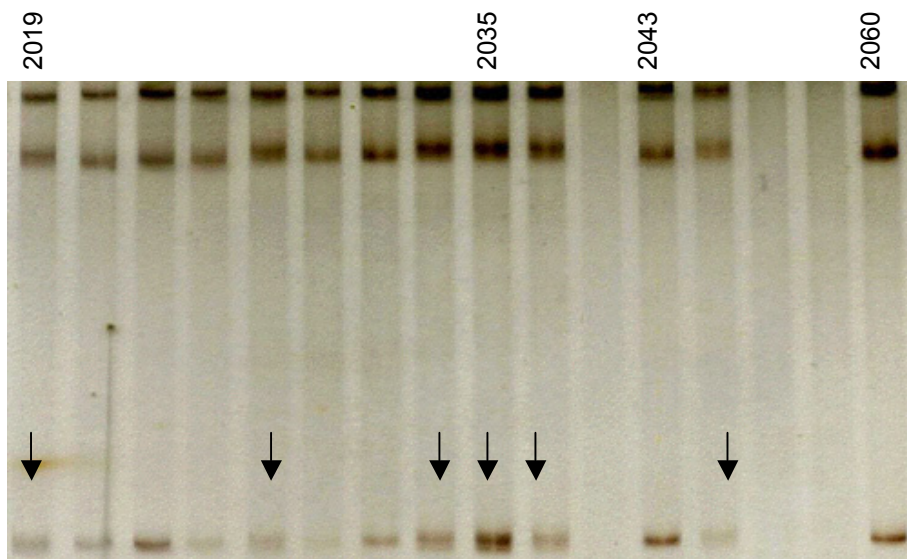


Abbildung 4.1-22: SSCA 49, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 9

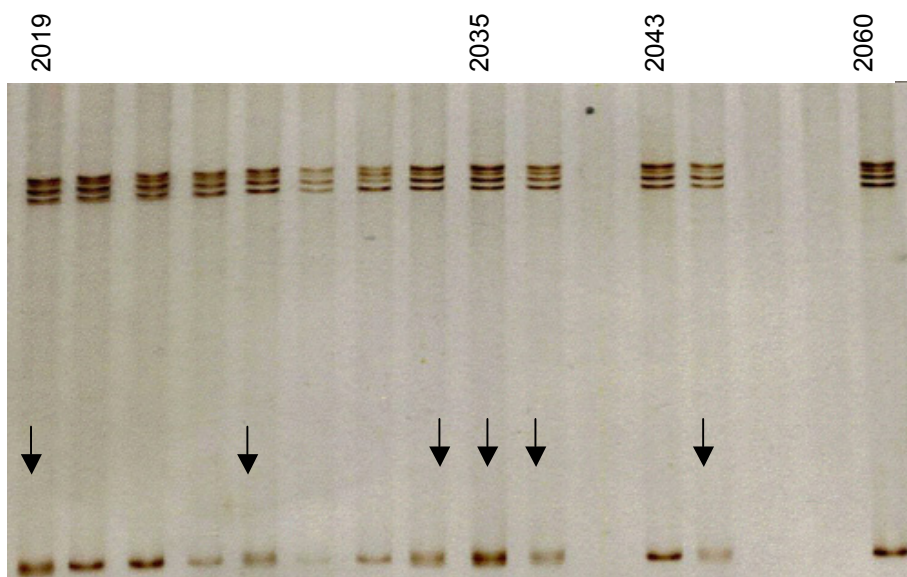


Abbildung 4.1-23: SSCA 51, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 9

Tabelle 4.1-8: Ergebnisse der Sequenzanalyse im Exon 9

DNA-Nummer	SSCA-Auffälligkeit	cDNA-Sequenzvariation
2035	Variante 2	c.724-8G>C (heterozygot)
2019	Variante 2	c.724-8G>C (heterozygot)
2043	Variante 1	Wildtyp
2060	Variante 1	Wildtyp

Das Variante 1-Muster entspricht dem homozygoten Wildtyp (Genotyp: G/G). Das Variante 2-Muster ist auf den heterozygoten Genotyp der Sequenzveränderung c.724-8G>C zurückzuführen (Abb. 4.1-24 und 4.1-25). Acht Basenpaare vor dem Start des Exons 9 kommt es im Intron 8 zu einem Austausch der Base Guanin durch Cytosin (Genotyp: G/C). Das Intron-3'Ende AG aus Adenin und Guanin bleibt erhalten und so wird das Intron 8 mit großer Wahrscheinlichkeit trotz der Variante c.724-8G>C vom Spleißosom korrekt erkannt.

Die heterozygoten Träger der Intronvariante c.724-8G>C (17/72) waren schon in der SSCA des Exons 4b und 7 aufgefallen. Neben dem heterozygoten Genstatus der Intron8-Variante c.724-8G>C tragen sie auch die heterozygote Form der Polymorphismen in Exon 4b und Intron 6 (WT/[c.378G>A(p.=Leu126Leu); c.519-75C>T; c.724-8G>C]). Klinisch sind bei ihnen keine signifikanten Unterschiede zu den anderen BBS-Patienten festzustellen.

Abbildung 4.1-24:

Homozygoter Wildtyp (Patient 2043)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2043, die in der SSCA ein Variante 1-Muster zeigte

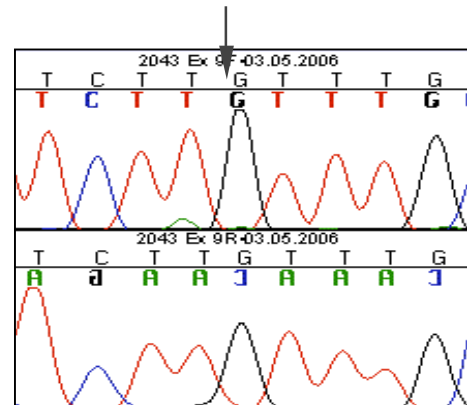
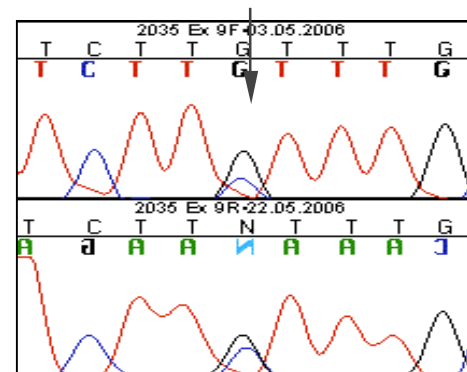


Abbildung 4.1-25:

Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung**c.724-8G>C (Patient 2035)**

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2035, die in der SSCA ein Variante 2-Muster bot. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.724-8G>C.



4.1.2.7 Exon 10, Primerkombination Ex10-93f/324r

In der SSCA zeigte sich bei keiner der 72 DNA-Proben ein auffälliges Fragmentmuster. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass im Exon 10 bei diesen Patienten keine Mutation zu finden ist.

Hier werden exemplarisch 9 der 72 Patienten-DNA-Fragmente bei 10°C und 20°C dargestellt (Abb. 4.1-26 und 4.1-27).

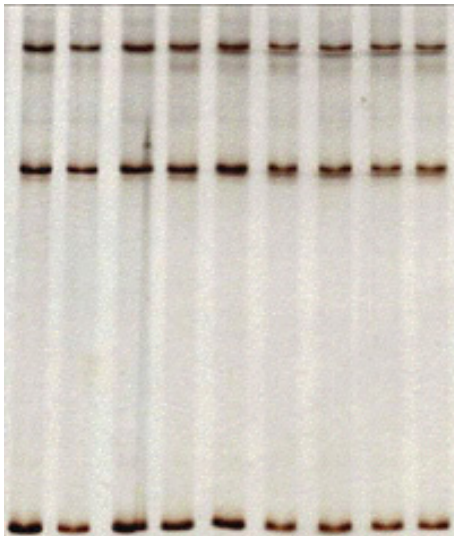


Abbildung 4.1-26:
SSCA 27, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 10

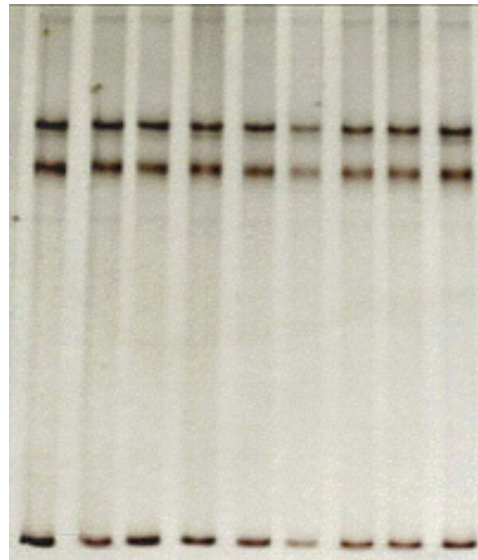


Abbildung 4.1-27:
SSCA 29, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 10

4.1.2.8 Exon 12, Primerkombination Ex12-300f/r

Da die Genotypisierung im Exon 12 bereits abgeschlossen war, sollten in der SSCA keine weiteren DNA-Proben als Kandidaten zur Mutationsanalyse selektiert werden. Vielmehr war das Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit der bereits nachgewiesenen Mutation c.1169T>G zu untersuchen, welche im Protein zur Aminosäuresubstitution p.Met390Arg führt. Die Abbildungen 4.1-28 und 4.1-29 zeigen Fragmentmuster von einem Patienten mit homozygotem Wildtyp neben einem homozygoten (p.Met390Arg/p.Met390Arg) und einem heterozygoten (WT/p.Met390Arg) Mutations-träger. Das Bandenmuster ist mit Pfeilen markiert, ein roter Pfeil deutet auf Fragmentmuster der Allele mit der Mutation p.Met390Arg und ein grüner Pfeil deutet auf die Banden des Wildtyp-Allels.

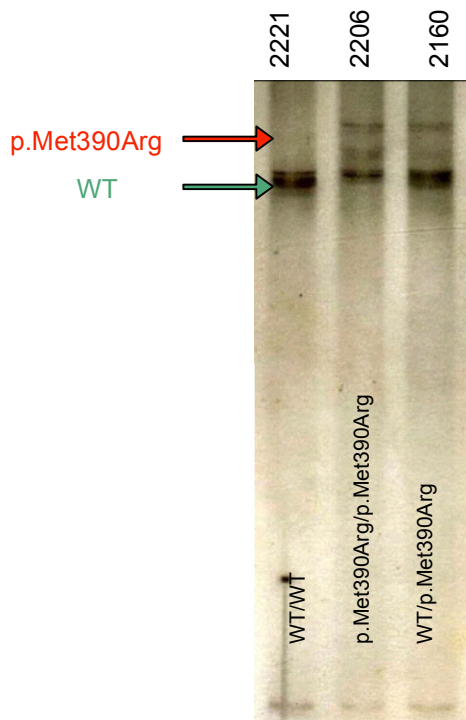


Abbildung 4.1-28 :
SSCA 42, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 12
WT=Wildtyp-Allel, p.Met390Arg=mutantes Allel



Abbildung 4.1-29 :
SSCA 43, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 12
WT=Wildtyp-Allel, p.Met390Arg=mutantes Allel

Es zeigte sich, dass DNA-Fragmente mit der p.Met390Arg-Mutation nur in der SSCA bei 10°C differenzierbar sind, bei 20°C lässt sich kein Unterschied zum Fragmentmuster des homozygoten Wildtyps erkennen. Bei einer Temperatur von 10°C zeigten Fragmente mit heterozygotem Genotyp (WT/p.Met390Arg) neben den Banden des Wildtyp-Allels (Genotyp: WT, markiert durch grünen Pfeil) eine zusätzliche Bande des mutanten Allels (Genotyp: p.Met390Arg, markiert durch roten Pfeil). Fragmente mit homozygotem Genstatus der Mutation p.Met390Arg zeigten ausschließlich die Banden des mutanten Allels (p.Met390Arg) (Abb. 4.1-28).

Die drei Patienten mit jeweils unterschiedlichem Genotyp wurden anschließend sequenziert. Die Ergebnisse von Enzymverdau und SSCA wurden bestätigt (Tab. 4.1-9 und Abb. 4.1-30 bis 4.1-32).

Tabelle 4.1-9: Ergebnisse der Sequenzanalyse im Exon 12

DNA-Nummer	SSCA-Auffälligkeit	cDNA-Sequenzvariation
2221	Variante 1	Wildtyp
2160	Variante 3	c.1169T>G (heterozygot)
2206	Variante 2	c.1169T>G (homozygot)

Abbildung 4.1-30:

Homozygoter Wildtyp (Patient 2221)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2221, die in der SSCA ein Variante 1-Muster zeigte.

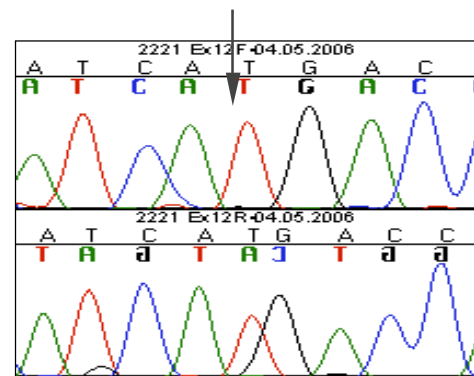


Abbildung 4.1-31:

**Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung
c.1169T>G (Patient 2160)**

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2160, die in der SSCA bei 10°C ein Variante 3-Muster bot. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.1169T>G.

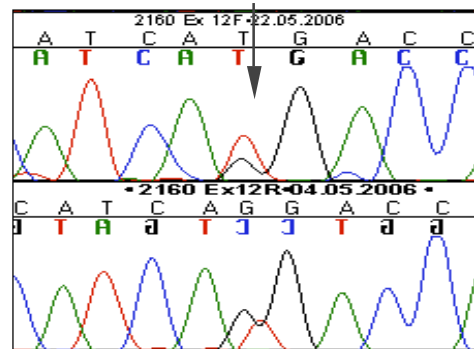
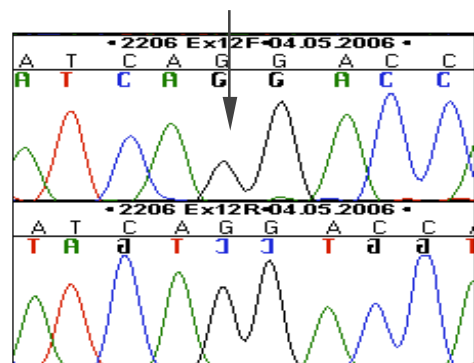


Abbildung 4.1-32:

**Homozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung
c.1169T>G (Patient 2206)**

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2206, die in der SSCA bei 10°C Variante 2-Muster bot. Auf beiden Allelen zeigt sich die Basensubstitution c.1169T>G.



Neben der häufigen Mutation p.Met390Arg und der Deletion von Exon 12 bis 13 (c.Ex12_Ex13del) ließ sich eine dritte Mutation im Exon 12 feststellen. Bei einem Patienten (2095) fand sich eine väterlich ererbte heterozygote Deletion von fünf Basenpaaren im Exon 12, c.1131_1135delCTTTG.

Auf Proteinebene wird dabei an Position 377 Cystein durch Tryptophan substituiert und es folgt ein Proteinabbruch durch ein Stoppkodon an Position 395. Diese Rasterschubmutation wird definiert durch p.Cys377TrpfsX19 und ist bereits in der Literatur beschrieben (Mykytyn et al. 2003). Der Patient 2095 weist mit einer klinisch festgestellten postaxialen Polydaktylie, Adipositas, Retinitis pigmentosa und einem Hypogonadismus mindestens vier Hauptmerkmale des BBS auf und zeigt keine signifikanten klinischen Unterschiede zu anderen BBS-Patienten.

4.1.2.9 Exon 13, Primerkombination Ex13f/r

Bei sowohl 10°C als auch 20°C konnte für Exon 13 ein klares SSCA-Ergebnis erzielt werden. Dabei war eine der 27/72 analysierten Proben wiederholt auffällig. Die DNA-Fragmente der Patientin 2203 zeigten unter beiden Temperaturbedingungen oberhalb zusätzliche Banden. In der Wiederholung war das Bandenmuster im Vergleich zum ersten Durchgang insgesamt verändert, jedoch blieb das Laufverhalten der DNA-Fragmente der Patientin 2203 auffällig (Abb. 4.1-33).

1.Durchführung



A)

2.Durchführung



B)



C)



D)

Abbildung 4.1-33: SSCA der Patientin 2203, PAA-Gel 12%, 10°C/20°C, Exon 13

A) SSCA28, 10°C, Ex13; B) SSCA30, 20°C, Ex13; C) SSCA45, 10°C Ex13; D) SSCA46, 20°C, Ex13

Die DNA der Patientin 2203 zeigt kein einheitliches Laufverhalten bei der SSCA-Wiederholung.

Die Sequenz des DNA-Fragments der Patientin 2203 entspricht dem homozygoten Wildtyp. Die SSCA hatte ein falsch positives Ergebnis geliefert. Die nicht durchführbare Reproduzierbarkeit weist darauf hin, dass dem auffälligen Laufverhalten wahrscheinlich eine fehlerhafte Durchführung der Methode zugrunde liegt.

In der Arbeit von Meyer konnten bei der Analyse der restlichen 45/72 Patienten zwei Mutationsträger nachgewiesen werden (Meyer 2008). Ein Patient (2089) trägt den heterozygoten Genstatus der Basenaustauschmutation c.1318C>T, welche zu der in der Literatur bereits beschriebenen Stoppmutation p.Arg440X führt. Durch eine Basensubstitution von Cytosin durch Thymin an Position 1318 der cDNA kommt es zum Stoppkodon an Stelle 440 des BBS1-Proteins (Beales et al. 2003). Der andere Patient (2095) trägt bei compound heterozygotem Genotyp auf dem einen Allel die mütterlich ererbte Mutation c.1339G>A, ein Austausch der Base Guanin durch Alanin an Position 1339 der cDNA. Im BBS1-Protein kommt es dadurch zur Aminosäureaustauschmutation p.Ala447Thr, Alanin wird durch Threonin an Position 447 ersetzt (Claus et al. 2007). Die Mutation p.Ala447Thr wird in der internationalen Literatur bisher nicht beschrieben. Auf dem anderen Allel weist der Patient eine väterlich ererbte Deletionsmutation im Exon 12 auf, die auf Proteinebene zu der Rasterschubmutation p.Cys377TrpfsX19 führt (Mykytyn et al. 2003). Es handelt sich deshalb bei Patient 2095 um einen compound heterozygoten Mutationsträger (p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr).

In Abbildung 4.1-34 wird der dazugehörige Stammbaum der Familie 2032 dargestellt. Hier zeigen sich die Charakteristika eines autosomal rezessiven Erbgangs, da nur bei der Person mit zwei mutanten Allelen im Genotyp das Syndrom im Phänotyp manifest wird.

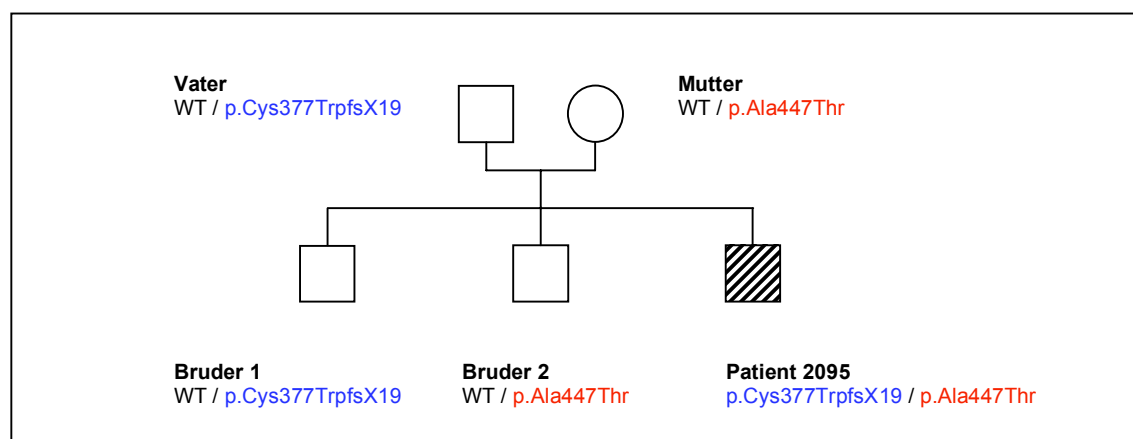


Abbildung 4.1-34: Stammbaum der Familie 2032 (Patient 2095)

Die Mutationen p.Arg440X und p.Ala447Thr waren bei jeweils 1/72 Patienten zu finden. Die beiden Mutationsträger weisen mit dem klinischen Befund von Adipositas, Retinitis pigmentosa, postaxialer Polydaktylie und Hypogonadismus mindestens vier der BBS-Hauptkriterien auf. Sie zeigen keine wesentlichen klinischen Unterschiede zu den anderen BBS-Patienten.

Bei einer früheren molekularen Mutationsanalyse wurde außerdem der homozygote Genstatus einer Deletion des Exons 12 und 13 gefunden (c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). Diese Mutation betrifft nur eine Patientin (1/72). Klinisch weist die Patientin drei Hauptmerkmale des BBS auf. Außerdem zeigt sie mit einem Sinus urogenitalis und einem Vorhofseptumdefekt typische Merkmale des McKusick-Kaufman Syndroms (MKKS).

4.1.2.10 Exon 15, Primerkombination Ex15f/r

Es waren keine Auffälligkeiten in der SSCA des Exons 15 feststellbar. Die Proben zeigten lediglich eine verschieden stark ausgeprägte Anfärbung ihrer Fragmentmuster.

Es werden die SSCA-Ergebnisse von 5/72 Patienten bei 10°C und 20°C präsentiert (Abb. 4.1-35 und 4.1-36).



Abbildung 4.1-35:
SSCA 28, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 15

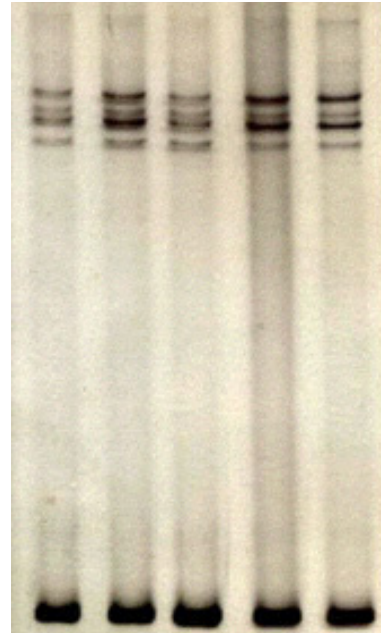


Abbildung 4.1-36:
SSCA 30, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 15

4.1.2.11 Exon 16, Primerkombination Ex16 123f/316r

Von den 72 analysierten Patienten zeigte ein Patient ein auffälliges Laufverhalten der DNA-Fragmente, welches einer Variante 2 zugeordnet wurde (Abb. 4.1-38). Bei 20°C waren in der SSCA des Patienten 2226 zusätzliche Banden der Einzelstränge zu erkennen, während bei 10°C keine Auffälligkeit feststellbar war (Abb. 4.1-37 und 4.1-38).

In einer weiteren SSCA wurde das PCR-Produkt der DNA des Patienten 2226 erneut aufgetragen gemeinsam mit den Proben seiner Eltern (2227, 2228), eines Bruders (2230) und seines Großvaters väterlicherseits (2229). Das Variante 2-Muster des Patienten bestätigte sich und beim klinisch gesunden Vater (2228) fand es sich ebenfalls. Die restlichen Mitglieder der Familie 2078, die Mutter, der Bruder und der Großvater, lieferten ein unauffälliges Fragmentmuster der Variante 1 (Abb. 4.1-39 und 4.1-40).

Das PCR-Produkt der DNA des Patienten (2226), seines Bruders (2230) sowie beider Eltern (2227, 2228) wurde sequenziert (Tab. 4.1-10). Es stellte sich heraus, dass dem auffälligen Fragmentmuster des Patienten und seines Vaters eine Basensubstitution c.1660A>T auf einem Allel des *BBS1*-Gens zugrunde liegt (Abb. 4.1-41 bis 4.1-44).

Tabelle 4.1-10: Ergebnisse der Sequenzanalyse im Exon 16

DNA-Nummer	SSCA-Auffälligkeit	cDNA-Sequenzvariation
2226 (Patient)	Variante 2	c.1660A>T (heterozygot)
2228 (Vater)	Variante 2	c.1660A>T (heterozygot)
2227 (Mutter)	Variante 1	Wildtyp
2230 (Bruder)	Variante 1	Wildtyp

Die Basensubstitution c.1660A>T führt im BBS1-Protein zur Mutation p.Ser554Cys, einem Aminosäureaustausch an Stelle 554, wobei die Aminosäure Serin durch Cystein ersetzt wird (Claus et al. 2007). Cystein hat im Gegensatz zu Serin eine schwefelhaltige polare Seitenkette. Durch Ausbildung von kovalenten Disulfidbrücken-Bindungen im Protein kann sich die Struktur des BBS1-Proteins entscheidend verändern, sodass die Funktion des Proteins beeinflusst wird. Die Mutation p.Ser554Cys war nur bei einem von 72 Patienten in heterozygoter Form nachweisbar. In der internationalen Literatur ist die Mutation p.Ser554Cys bisher noch nicht beschrieben.

Der Patient 2226 und sein Vater 2228 sind heterozygote Mutationsträger (WT/p.Ser554Cys). Der Patient 2226 weist eine Adipositas, Retinitis pigmentosa sowie eine postaxiale Polydaktylie auf. Außerdem liegt bei ihm eine mentale Retardierung vor. Sein Vater und die restlichen Familienmitglieder zeigen keine Symptome des BBS.

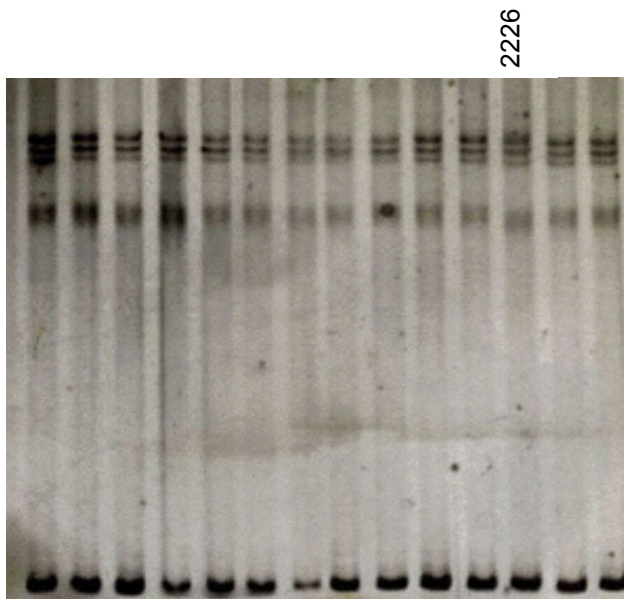


Abbildung 4.1-37: SSCA 10, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 16

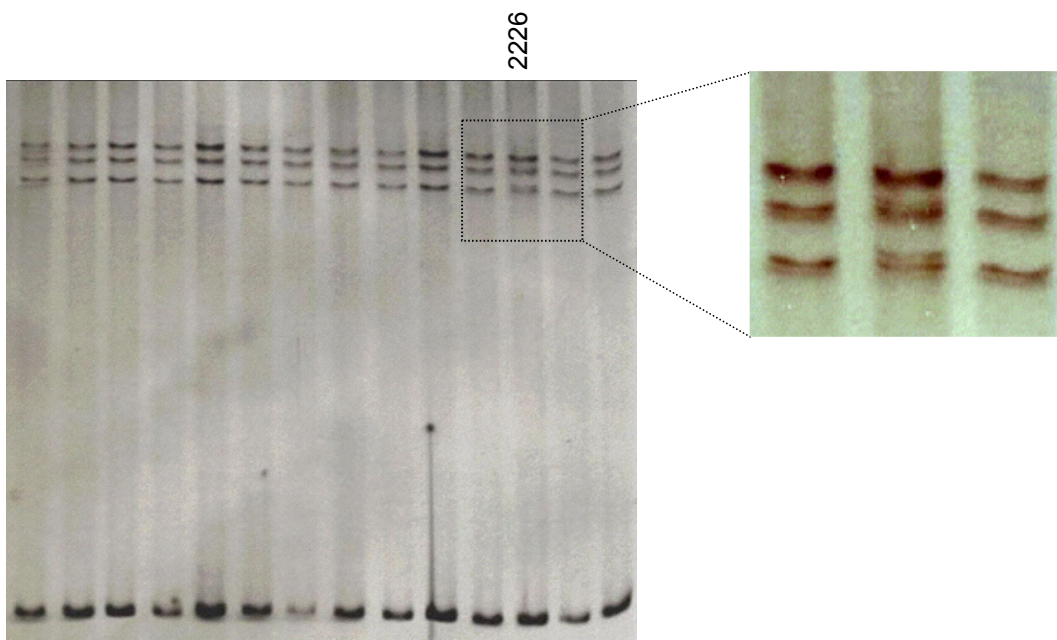


Abbildung 4.1-38: SSCA 3, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 16

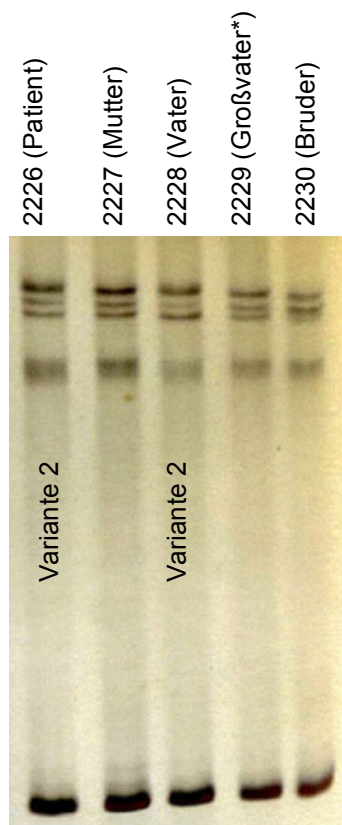


Abbildung 4.1-39:
SSCA 71, PAA-Gel 12%, 10°C, Exon 16

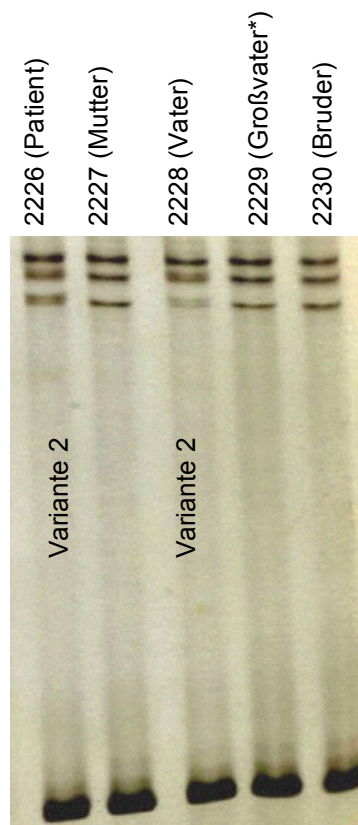


Abbildung 4.1-40:
SSCA 73, PAA-Gel 12%, 20°C, Exon 16

*Es handelt sich um den Großvater väterlicherseits.

Abbildung 4.1-41:
Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung c.1660A>T (Patient 2226)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2226, die in der SSCA bei 20°C ein Variante 2-Muster ergab. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.1660A>T.

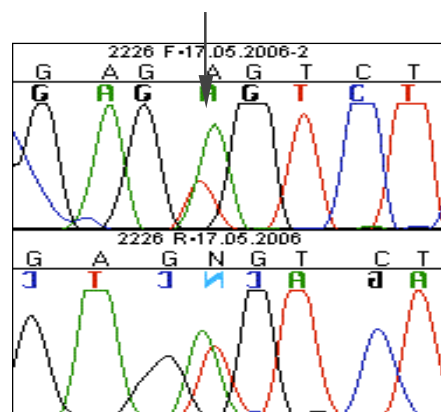


Abbildung 4.1-42:
Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung c.1660A>T (Vater, 2228)

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2228, die in der SSCA bei 20°C ein Variante 2-Muster ergab. Auf einem Allel zeigt sich die Basensubstitution c.1660A>T.

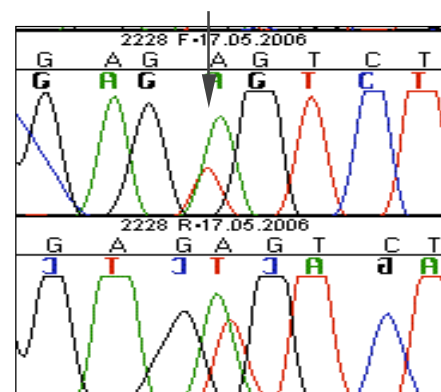


Abbildung 4.1-43:

**Homozygoter Wildtyp
(Mutter, 2227)**

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2227, die in der SSCA ein Variante 1-Muster zeigte.

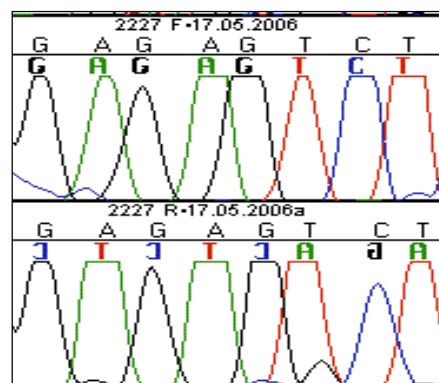
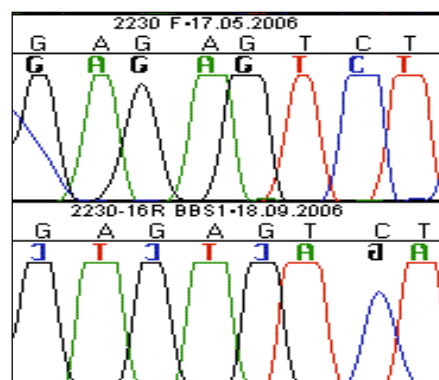


Abbildung 4.1-44:

**Homozygoter Wildtyp
(Bruder, 2230)**

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2230, die in der SSCA ein Variante 1-Muster zeigte.



4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zu *BBS1*

Die Ergebnisse der Analyse des *BBS1*-Gens setzen sich zusammen aus den Resultaten des *AvaII*-Enzymverdaus zur Genotypisierung von p.Met390Arg und den Ergebnissen der SSCA von zehn der 17 *BBS1*-Exons. Es konnten dabei nicht alle 76 Patienten mit eingeschlossen werden (Tab. 4.1-11). Zur Genotypisierung von p.Met390Arg liegen Ergebnisse zu 75/76 Patienten vor. Darunter befinden sich 54 Patienten deutscher, 12 Patienten türkischer und neun Patienten anderer Herkunft. Eine Patientin türkischer Herkunft wurde nicht berücksichtigt, weil bei ihr eine Deletion der Exons 12-13 besteht (c.Ex12_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). Zu 72/76 Patienten liegen SSCA-Ergebnisse vor. Davon stammen 53 Patienten aus Deutschland, 13 Patienten aus der Türkei und sechs Patienten sind anderer Herkunft. Vier Patienten konnten nicht mit eingeschlossen werden, da ihre Blutproben erst eintrafen als die SSCA bereits abgeschlossen war (Tab. 4.1-11).

Tabelle 4.1-11: Aufgliederung der Patienten, bei denen eine Analyse des *BBS1*-Gens erfolgt ist.

Gen	Untersuchung	Anzahl der analysierten Patienten	Herkunft
<i>BBS1</i>	Genotypisierung von p.Met390Arg in <i>BBS1</i>	75	54 Deutschland
			12 Türkei
			9 andere
	SSCA von zehn Exons in <i>BBS1</i>	72	53 Deutschland
			13 Türkei
			6 andere

4.1.3.1 Mutationen in *BBS1*

Unter den 75 für p.Met390Arg genotypisierten Patienten befinden sich 89,3% (67/75) Träger des homozygoten Wildtyps (WT/WT), 2,7% (2/75) sind heterozygote Träger der Mutation (WT/p.Met390Arg) und 8,0% (6/75) sind homozygote Mutationsträger (p.Met390Arg/p.Met390Arg). Die Allelfrequenz für das mutante Allel p.Met390Arg liegt demnach bei 9,3% (Tab. 4.1-12).

Die acht Mutationsträger sind alle deutscher Herkunft, was bei 54 deutschen der 75 für p.Met390Arg genotypisierten Patienten einen Anteil von 14,8% (8/54) ausmacht. Die zwölf türkischen Patienten und die neun Patienten anderer Herkunft tragen an der entsprechenden Stelle der cDNA den homozygoten Wildtyp.

Tabelle 4.1-12: Ergebnisse der Genotypisierung von p.Met390Arg bei 75 Patienten

Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
WT/WT	67/75	89,3%	89,3%
WT/p.Met390Arg	2/75	2,7%	9,3%
p.Met390Arg/p.Met390Arg	6/75	8,0%	

WT=Wildtyp-Allel, p.Met390Arg=mutantes Allel

Von den 72 Patienten, bei denen eine SSCA durchgeführt werden konnte, sind 83,3% (60/72) Träger des homozygoten Wildtyps von *BBS1*. Die restlichen 16,7% (12/72) tragen mindestens ein mutantes Allel in *BBS1*. Es sind 11,1% (8/72) der Patienten Träger der Mutation p.Met390Arg. Bei 5,6% (4/72) fanden sich andere Mutationen (Tab. 4.1-13). Zwei dieser Mutationsträger sind türkischer Herkunft, wobei eine Patientin (2017) den homozygoten Genotyp mit einer Deletion der Exons 12-13 zeigt (c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del) und ein Patient (2226) den heterozygoten Genotyp einer Punktmutation im Exon 16 aufweist (WT/p.Ser554Cys). Die beiden anderen Mutationsträger stammen aus Deutschland. Ein deutscher Patient (2095) ist compound heterozygoter Mutationsträger einer väterlich ererbten Rasterschubmutation p.Cys377TrpfsX19 im Exon 12 sowie einer mütterlich ererbten Punktmutation p.Ala447Thr im Exon 13 (p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr) (Abb. 4.1-34). Der andere deutsche Patient (2089) ist heterozygoter Mutationsträger einer Punktmutation im Exon 13 (WT/p.Arg440X) in Kombination mit der heterozygoten Form benigner Polymorphismen im Exon 4b, Intron 6 und Intron 8.

Nach Auswertung der SSCA liegt die Allelfrequenz für ein mutantes Allel in *BBS1* insgesamt bei 13,9% (20/144). Davon macht die Allelfrequenz für p.Met390Arg 9,7% (14/144) aus. Andere Mutationen haben gemeinsam einen Anteil von 4,2% (6/144) (Tab. 4.1-13).

Tabelle 4.1-13: Mutationen in *BBS1* bei 72 Patienten, analysiert mit SSCA

Exon	Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
BBS1 gesamt	WT/WT	60/72	83,3%	83,3%
	WT/MUT	4/72	5,6%	13,9%
	MUT/ MUT	8/72	11,1%	
12	WT/p.Met390Arg	2/72	2,8%	9,7%
	p.Met390Arg/p.Met390Arg	6/72	8,3%	
BBS1 gesamt	Andere Mutationen in <i>BBS1</i>	4/72	5,6%	4,2%
12	c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del	1/72	1,4%	1,4%
12 + 13	p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr	1/72	1,4%	0,7%
13	WT/p.Arg440X	1/72	1,4%	0,7%
16	WT/p.Ser554Cys	1/72	1,4%	0,7%

WT=Wildtyp-Allel, MUT und benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

Unter alleiniger Berücksichtigung der 53 deutschen von den 72 SSCA-Patienten ergeben sich andere Zahlenwerte. Bei zehn Patienten deutscher Herkunft lagen Mutationen in *BBS1* vor, dies entspricht 18,9% (10/53). Es sind 15,1% (8/53) Träger der Mutation p.Met390Arg, zwei davon in heterozygoter (2/53) und sechs in homozygoter Form (6/53). Zwei weitere deutsche Patienten tragen andere Mutationen (2/53), nämlich den heterozygoten Genotyp von p.Arg440X (Patient 2089) und den compound heterozygoten Genotyp p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr (Patient 2095).

Zum Vergleich werden die in der internationalen Literatur beschriebenen Häufigkeitsverteilung von *BBS1*-Mutationen in Tabelle 4.1-14 präsentiert. Alle bisher bekannten *BBS1*-Mutationen sind in Tabelle 4.1-15 aufgelistet. Daraus geht hervor, dass bis auf p.Met390Arg, p.Arg440X und p.Cys377TrpfsX19 die in dieser Studie analysierten Mutationen noch nicht beschrieben worden sind (Beales et al. 2003).

Es lassen sich klinisch keine wesentlichen Unterschiede der phänotypischen Merkmalsausprägung einzelner Mutationsträger feststellen. Alle Patienten weisen die zur Diagnose des BBS notwendigen klinischen Hauptkriterien auf. Nur die homozygote Trägerin einer Deletion der Exons 12-13 (c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del) bietet mit einem Sinus urogenitalis und einem Vorhofseptumdefekt außerdem typische Merkmale des McKusick-Kaufman Syndroms (MKKS).

Tabelle 4.1-14: Ergebnisse der Genotypisierung von p.Met390Arg bei 259 Familien von Beales et al. 2003

Exon	Genotyp	Familien	%	Allelfrequenz
BBS1 gesamt	WT/WT	199/259	76,8%	76,8%
	WT/MUT	60/259	23,2%	21,4%
	MUT/MUT			
12	WT/p.Met390Arg	20/259	7,7%	14,3%
	p.Met390Arg/p.Met390Arg	27/259	10,4%	
BBS1 gesamt	Andere Mutationen in <i>BBS1</i>	13/259	5,0%	7,1%

WT=Wildtyp-Allel, MUT und benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

Tabelle 4.1-15: Mutationen in *BBS1*

Es handelt sich überwiegend um Punktmutationen, wie Aminosäureaustauschmutationen und Stoppmutationen. (Acc.No.: AF503941)

Exon	Mutation	Literatur	Exon	Mutation	Literatur
2	p.H35R	5	11	p.M347fsX373	2
3	p.K53E	5	12	p.389del	5
4	c.432+1G>A	1	12	p.M390R	1
4	p.Y113X	2	12	p.C377_F378delfsX412	2
4	p.V114fsX150	2	13	p.R429X	5
4	p.L75fsX98	5	13	p.Y434S	5
4	p.Q128X	5	13	p.R440X	5
5	p.R146X	5	13	c.IVS13-2A>G	5
5	p.D148N	5	14	p.R483X	5
8	p.E234K	4	15	p.L503H	5
8	p.I200_T201del	2	15	p.L505fsX556	2
9	g.IVS9-3C>G	5	15	p.L518Q	5
10	p.Y284fsX288	1	15	p.L518P	2
10	p.Q291X	5	15	c.IVS115+2T>G	3
10	p.G305S	5	16	p.L548fsX579	5

Literatur:

- 1 (Mykytyn et al. 2002)
- 2 (Mykytyn et al. 2003)
- 3 (Badano et al. 2003b)
- 4 (Badano et al. 2003a)
- 5 (Beales et al. 2003)

4.1.3.2 Polymorphismen in *BBS1*

Neben Mutationen, welche die Proteinsequenz verändern, konnten bei über 40% (29/72) der Patienten in der SSCA auch verschiedene Polymorphismen gefunden werden, die voraussichtlich keinen Einfluss auf das BBS1-Protein haben (Tab. 4.1-16). Den größten Anteil machen die Intronvariante c.519-75C>T im Intron 6 sowie die stille Sequenzvariante c.378G>A(p.=Leu126Leu) im Exon 4 aus. Sie traten immer gemeinsam auf und waren bei 38,9% (28/72) der Patienten nachweisbar. Seltener war die Intronvariante c.724-8G>C zu finden, die 8bp vor dem Exon 9 im Intron 8 lokalisiert ist. Sie ist bei 23,6% (17/72) der Patienten vorhanden und immer mit c.378G>A(p.=Leu126Leu) und c.519-75C>T assoziiert. Ein weiterer Polymorphismus ist c.479+31_32insC im Intron 5, welcher nur bei einem Patienten auftrat (1/72, 1,4%) und mit keiner weiteren Sequenzveränderung kombiniert war. Der Genstatus der Polymorphismen war jeweils heterozygot. Eine Ausnahme bildet der Patient 2125, der homozygoter Träger von c.378G>A(p.=Leu126Leu) und c.519-75C>T ist. Die Polymorphismen ergeben gemeinsam eine Allelfrequenz von 20,8%.

Höchstwahrscheinlich haben diese Polymorphismen auf den BBS-Phänotyp keine Auswirkung.

Tabelle 4.1-16: analysierte Polymorphismen in *BBS1* bei 72 Patienten

Exon/Intron	Sequenzvariation	Patienten	%	Allelfrequenz	innerhalb <i>BBS1</i> kombiniert mit
<i>BBS1</i> gesamt	Keine Polymorphismen	43/72	81,9%	59,7%	—
	Polymorphismen	29*/72	40,3%*	20,8%*	—
Exon 4	c.378G>A(p.=Leu126Leu)	28/72	38,9%	20,1%	c.519-75C>T und p.Arg440X
Intron 5	c.479+31_32insC	1/72	1,4%	0,7%	solitär
Intron 6	c.519-75C>T	28/72	38,9%	20,1%	c.378G>A(p.=Leu126Leu) und p.Arg440X
Intron 8	c.724-8G>C	17/72	23,6%	11,8%	c.378G>A(p.=Leu126Leu), c.519-75C>T und p.Arg440X

*die Summe der verschiedenen Polymorphismen ist größer als die Anzahl betroffener Patienten, da 17 Patienten 3 verschiedene und 11 Patienten 2 verschiedene Polymorphismen tragen.

4.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse von Exon 2 in *BBS10*

Das *BBS10*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert. Es wird angenommen, dass sich bei 20% der BBS-Patienten Mutationen in *BBS10* finden, und dass 12,9% aller BBS-Patienten Träger der Mutation p.Cys91LeufsX5 sind (Abb. 4.2-1) (Stoetzel et al. 2006). Die Benennung der Mutationen erfolgte in der vorliegenden Arbeit gemäß der gängigen Nomenklatur in Anlehnung an die aktuellen Empfehlungen der Human Genome Variation Society (den Dunnen and Antonarakis 2000). In der Publikation von Stoetzel und Mitarbeitern wurde eine andere Nomenklatur verwendet, sodass die Mutation p.Cys91LeufsX5 dort mit der Formel C91fsX95 bezeichnet ist (Stoetzel et al. 2006).

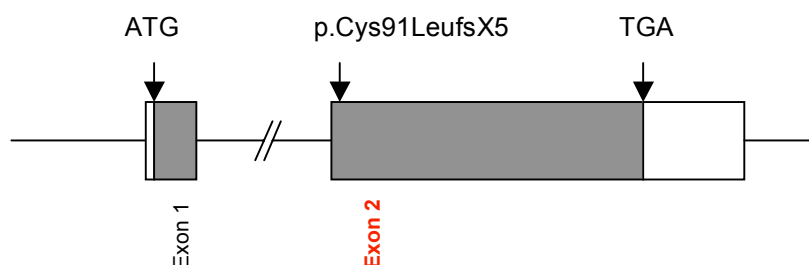


Abbildung 4.2-1: Genstruktur von *BBS 10* (Stoetzel et al. 2006)

Die Rechtecke stellen die beiden Exons dar. Der kodierende Sequenzanteil ist grau eingefärbt. Die häufigste Mutation p.Cys91LeufsX5 liegt im Exon 2.

Die Mutation p.Cys91LeufsX5 in *BBS10* ist neben der *BBS1*-Mutation p.Met390Arg die bisher einzige bekannte Mutation, welche häufiger bei BBS-Patienten auftritt (Beales et al. 2003; Stoetzel et al. 2006). Die Ergebnisse zur Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5 haben daher große Bedeutung und werden vor den Ergebnissen zu anderen Mutationen in *BBS10* dargestellt. Als Referenz diente die Sequenz mit der Accession-Number NM_024685.2. Es wurden 76 Patienten untersucht (Tab. 4.2-1). Die Gruppe der 72 Patienten, bei denen eine SSCA in *BBS1* durchgeführt wurde, ist um 4 Patienten erweitert worden, eine Patientin deutscher Herkunft und drei Patienten aus Griechenland, den Niederlanden und Australien.

Tabelle 4.2-1: Aufgliederung der 76 Patienten, bei denen eine molekulargenetische Analyse von *BBS10* durchgeführt wurde.

Gen	Untersuchung	Anzahl der analysierten Patienten	Herkunft
<i>BBS10</i>	Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5 in <i>BBS10</i>	76	54 Deutschland
	Sequenzierung von Exon 2 in <i>BBS10</i>		13 Türkei
			9 andere

4.2.1 Mutationsanalyse für c.270_271insT (p.Cys91LeufsX5)

Die Rasterschubmutation p.Cys91LeufsX5 im BBS10-Protein ist zurückzuführen auf die Insertion einer zusätzlichen Base in die cDNA-Sequenz. Zwischen Thymin an Position 270 und Guanin an Position 271 fügt sich die Base Thymin ein (c. 270_271 insT). Dies führt zu einer Umwandlung des Kodons für Cystein zu einem Kodon für Leucin an Stelle 91 des Proteins. In der Folge kommt es beim 5. Kodon strangaufwärts zu einem vorzeitigen Proteinabbruch durch ein Stoppkodon an Position 95 des Proteins. Insgesamt wird diese Rasterschubmutation auf Proteinebene mit der Formel p.Cys91LeufsX5 beschrieben (den Dunnen and Antonarakis 2000).

Es zeigte sich, dass die Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5 nur mittels einer Sequenzierung des 214bp umfassenden PCR-Produkts vom Exon 2 in *BBS10* vorgenommen werden kann (Tab. 2.3-4). In der SSCA war nur das Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit heterozygotem Genstatus der Mutation (WT/p.Cys91LeufsX5) differenzierbar. Das SSCA-Muster von DNA-Fragmenten mit homozygotem Genotyp der Mutation p.Cys91LeufsX5 (p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5) war nicht vom Laufverhalten der DNA-Fragmente mit homozygotem Wildtyp von *BBS10* zu unterscheiden. Folglich werden in der SSCA alle homozygoten Träger von p.Cys91LeufsX5 übersehen.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der jeweiligen DNA-Fragmente sind in die abgebildeten SSCA-Gele eingetragen (Abb. 4.2-2 bis 4.2-5). Es ist dabei gut zu erkennen, dass die Fragmentmuster der Patientin 2238 (Abb. 4.2-4 und 4.2-5) und die des Patienten 2197 (Abb. 4.2-2 und 4.2-3) keine Unterschiede aufwiesen, beide zeigten ein Fragmentmuster der Variante 1. Nach der Sequenzierung aber wird klar, dass Patientin 2238 den homozygoten Genotyp der Mutation (p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5) trägt und Patient 2197 Träger des homozygoten Wildtyps ist (WT/WT) (Abb. 4.2-6 und 4.2-7).

Patient 2031 und Patient 2040 hoben sich bereits in der SSCA durch ihr Fragmentmuster von der Mehrheit der restlichen DNA-Fragmente ab, sie boten ein Laufverhalten der Variante 2. Bei 10°C und einer PAA-Gel-Konzentration von 12% waren sowohl in der Einzelstrang-Konformation (blauer Pfeil) als auch in der Doppelstrang-Konformation (grüner Pfeil) zusätzliche Banden sichtbar (Abb. 4.2-4). Bei 20°C blieben nur die zusätzlichen Banden in der Doppelstrang-Konformation erhalten (Abb. 4.2-5). Mithilfe der Sequenzierung wurde anschließend eindeutig der heterozygote Genotyp mit der Mutation p.Cys91LeufsX5 festgestellt (WT/p.Cys91LeufsX5) (Abb. 4.2-8).

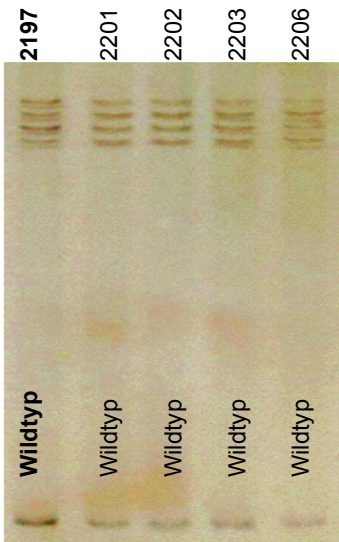


Abbildung 4.2-2:
SSCA 1, PAA-Gel 12%, 10°C, *BBS10*-Exon 2

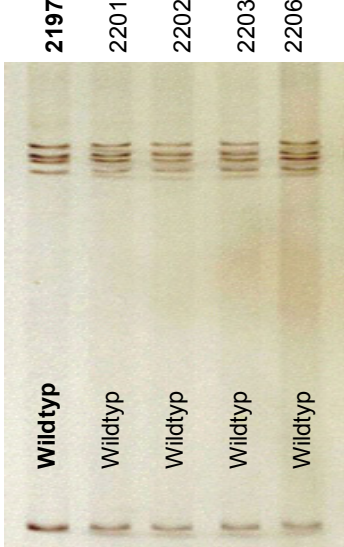


Abbildung 4.2-3:
SSCA 3, PAA-Gel 12%, 20°C, *BBS10*-Exon 2

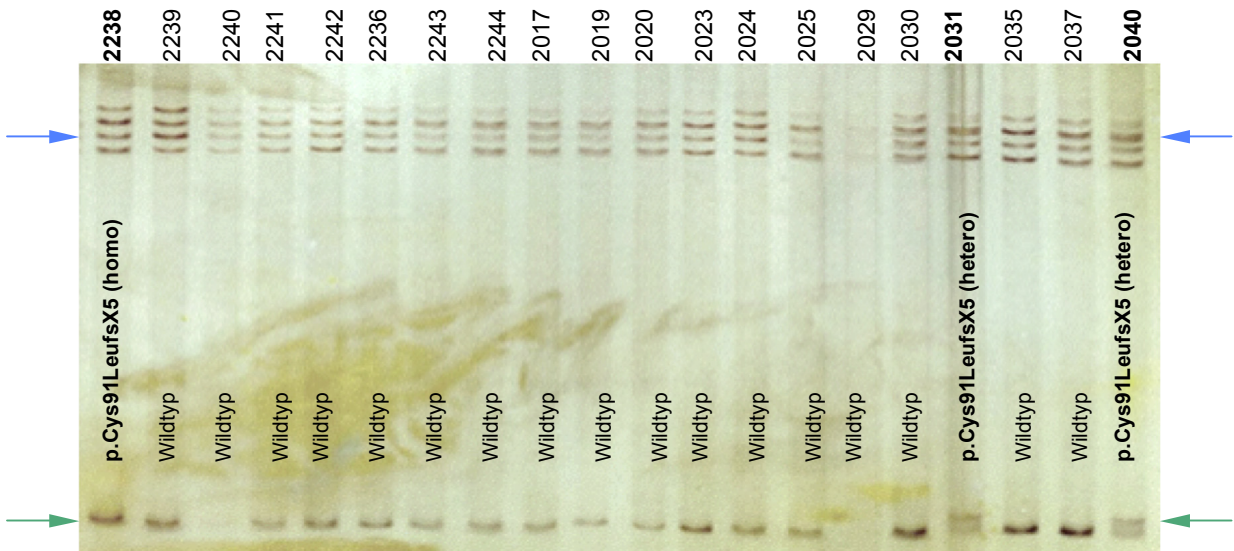


Abbildung 4.2-4: SSCA 2, PAA-Gel 12%, 10°C, *BBS10*-Exon 2

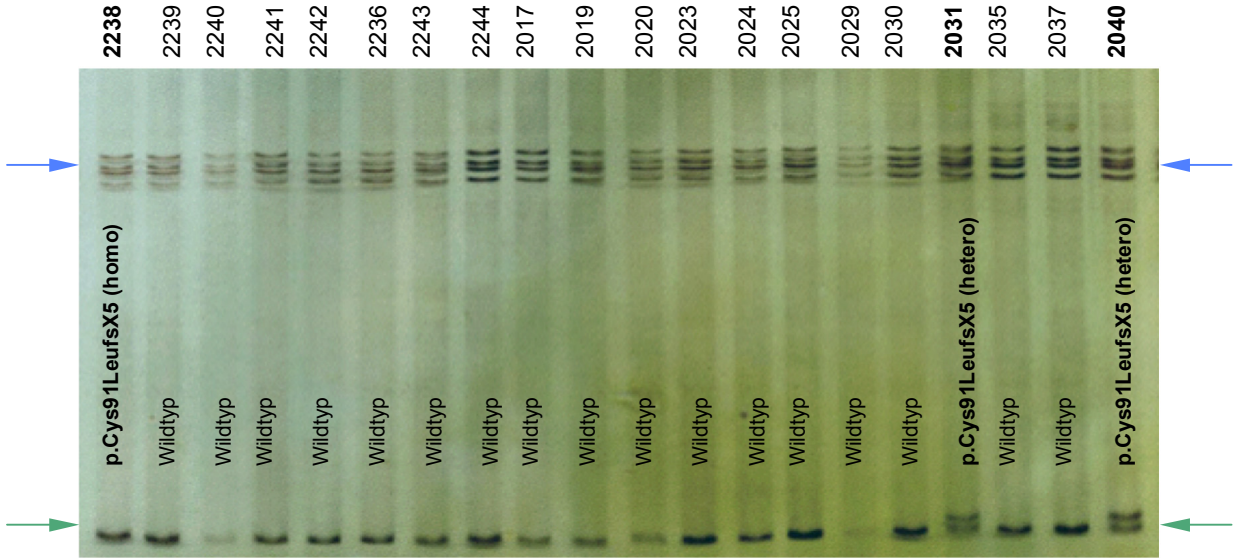
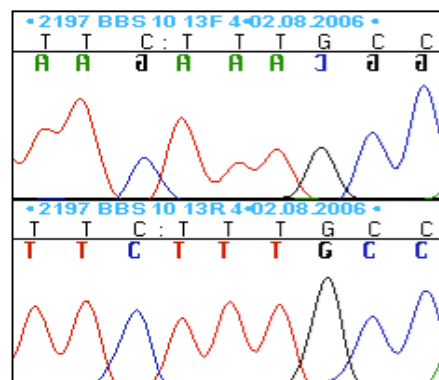


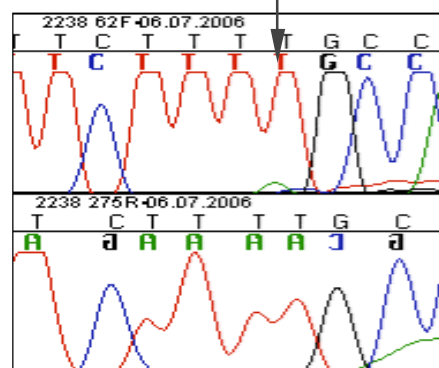
Abbildung 4.2-5: SSCA 4, PAA-Gel 12%, 20°C, *BBS10*-Exon 2
(hetero)=Heterozygote Mutation, (homo)=Homozygote Mutation

Abbildung 4.2-6:**Homozygoter Wildtyp (Patient 2197)**

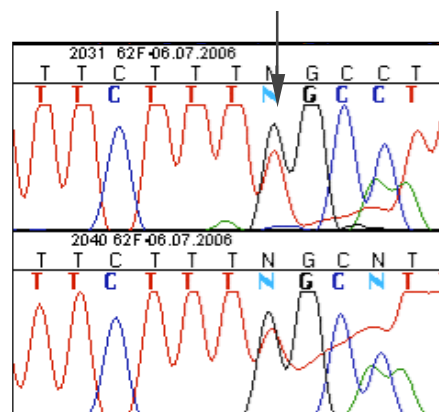
Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2197, die in der SSCA ein Fragmentmuster Variante 1 zeigte.

**Abbildung 4.2-7:****Homozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung c.270_271insT (Patientin 2238)**

Forward- und Reverse-Sequenzierung der Probe 2238, die in der SSCA ein Fragmentmuster Variante 1 zeigte. Es ist auf beiden Allelen die Insertion einer vierten Base Thymin erkennbar.

**Abbildung 4.2-8:****Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung c.270_271insT (Patienten 2031 und 2040)**

Forward-Sequenzierung der Proben 2031 und 2040, die in der SSCA ein Fragmentmuster Variante 2 zeigten. Es ist auf einem Allel die Insertion einer vierten Base Thymin erkennbar. Wegen des heterozygoten Genotyps waren die Reverse-Sequenzen nicht auswertbar.



Zur Erfassung sämtlicher Träger der Mutation p.Cys91LeufsX5, besonders in homozygoter Form, wurden die PCR-Produkte (214bp, Tab. 2.3-4) aller 76 Patienten, ungeachtet ihres Fragmentmusters in der SSCA, sequenziert. Zur Genotypisierung der p.Cys91LeufsX5-Mutation genügt die Auswertung des Bereichs um die Position 270 (c.270T bis c.271G) in der Forward-Sequenz (Tab. 4.2-2).

Tabelle 4.2-2: Charakteristika der Forward-Sequenz zur Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5

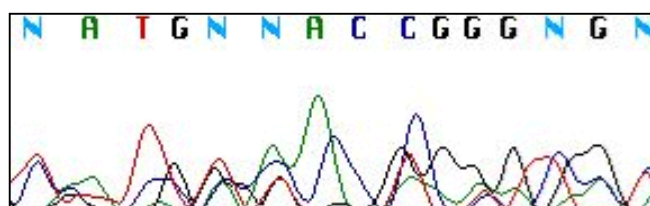
Genotyp	Charakteristika der Forward-Sequenz
WT/WT	Es lässt sich keine Veränderung im Vergleich zur Referenzsequenz feststellen. Die Mutation p.Cys91LeufsX5 liegt nicht vor.
WT/ p.Cys91LeufsX5	Ab c.270T wird die Forward-Sequenz ungeordnet und ist nicht mehr zu interpretieren.
p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	Die Forward-Sequenz liefert in ihrer vollen Länge ein klares Sequenzierungsergebnis mit einer eindeutig zu identifizierenden Insertion von Thymin zwischen c.270T und c.271G.

WT=Wildtyp-Allel, p.Cys91LeufsX5=mutantes Allel

Auf eine Reverse-Sequenzierung wurde zunächst verzichtet, da sie zur Auswertung des Genotyps von p.Cys91LeufsX5 überflüssig ist. Da es sich bei p.Cys91LeufsX5 um eine Rasterschubmutation handelt, ist das Ergebnis eines DNA-Fragments mit heterozygotem Genstatus von p.Cys91LeufsX5 in der reversen Doppelstrang-Sequenzierung zudem nicht interpretierbar. Man erhält zwei unterschiedliche, in sich verschobene Signale, weil der Reverse-Primer im mutanten Allel im Vergleich zum Wildtyp-Allel an einer im Leseraster versetzten Stelle bindet. Die Überlagerung der beiden Signale macht eine Auswertung der Sequenz in der Doppelstrang-Sequenzierung unmöglich (Abb. 4.2-9).

Abbildung 4.2-9:

Reverse-Sequenz eines heterozygoten Mutationsträgers von p.Cys91LeufsX5



Es konnte bei insgesamt 21,1% (16/76) der analysierten Patienten die Mutation p.Cys91LeufsX5 mit mindestens einem mutanten Allel gesichert werden. Davon sind 9,2% (7/76) heterozygote Mutationsträger (WT/p.Cys91LeufsX5) und 11,8% (9/76) homozygote Mutationsträger (p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5). Die Mehrzahl der Patienten, nämlich 78,9% (60/76), trägt in diesem Sequenzbereich den homozygoten Wildtyp (WT/WT). Die Allelfrequenz von p.Cys91LeufsX5 liegt somit für diese Studienpopulation bei 16,4% (Tab. 4.2-3).

Heterozygote Mutationsträger (WT/p.Cys91LeufsX5) boten im Rückblick alle ein charakteristisches, gut identifizierbares Fragmentmuster in der SSCA, während sämtliche homozygoten Mutationsträger (p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5) in der SSCA dasselbe Fragmentmuster lieferten wie die Träger des homozygoten Wildtyps (WT/WT).

Tabelle 4.2-3: Ergebnisse der Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5 bei 76 Patienten

Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
WT/WT	60/76	78,9%	78,9%
WT/p.Cys91LeufsX5	7/76	9,2%	16,4%
p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	9/76	11,8%	

WT=Wildtyp-Allel, p.Cys91LeufsX5=mutantes Allel

Unter den Mutationsträgern befindet sich nur eine türkische Patientin (Patientin 2221). Ihre Eltern sind blutsverwandt und sie trägt einen homozygoten Genotyp der Mutation p.Cys91LeufsX5 (p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5). Zum Zeitpunkt dieser Datenerhebung waren ihre Merkmalsausprägungen im Phänotyp unbekannt, da kein klinischer Befund vorlag.

Die übrigen 15 Patienten, die von der Mutation in homo- oder heterozygoter Form betroffen sind, stammen aus Deutschland, sodass p.Cys91LeufsX5 bei deutschen BBS-Patienten mit einer Häufigkeit von 27,8% (15/54) vorzufinden ist.

In Tabelle 4.2-4 werden die phänotypischen Merkmalsausprägungen der 16 p.Cys91LeufsX5-Mutationsträger ihrem jeweiligen Genotyp gegenüber gestellt. Bei 56,25% (9/16) dieser Patienten manifestiert sich das Syndrom im Phänotyp mit mindestens drei von sechs Hauptmerkmalen. Zu vier Patienten liegen keine klinischen Angaben vor (4/16), eine Patientin mit heterozygotem Genotyp weist keine Polydaktylie auf (1/16) und bei zwei noch sehr jungen Patienten mit homozygotem Genotyp ist bisher keine Retinitis pigmentosa aufgetreten (2/16). In *BBS1* konnte bei keinem der Mutationsträger von p.Cys91LeufsX5 eine Sequenzveränderung gefunden werden, insbesondere p.Met390Arg ließ sich nicht nachweisen. Bei den heterozygoten Mutationsträgern fehlt deshalb bisher die Identifikation des BBS-Haupt-Genlocus (Abb. 1.6-2).

Tabelle 4.2-4: Gegenüberstellung des p.Cys91LeufsX5-Genotyps und des BBS-Phänotyps

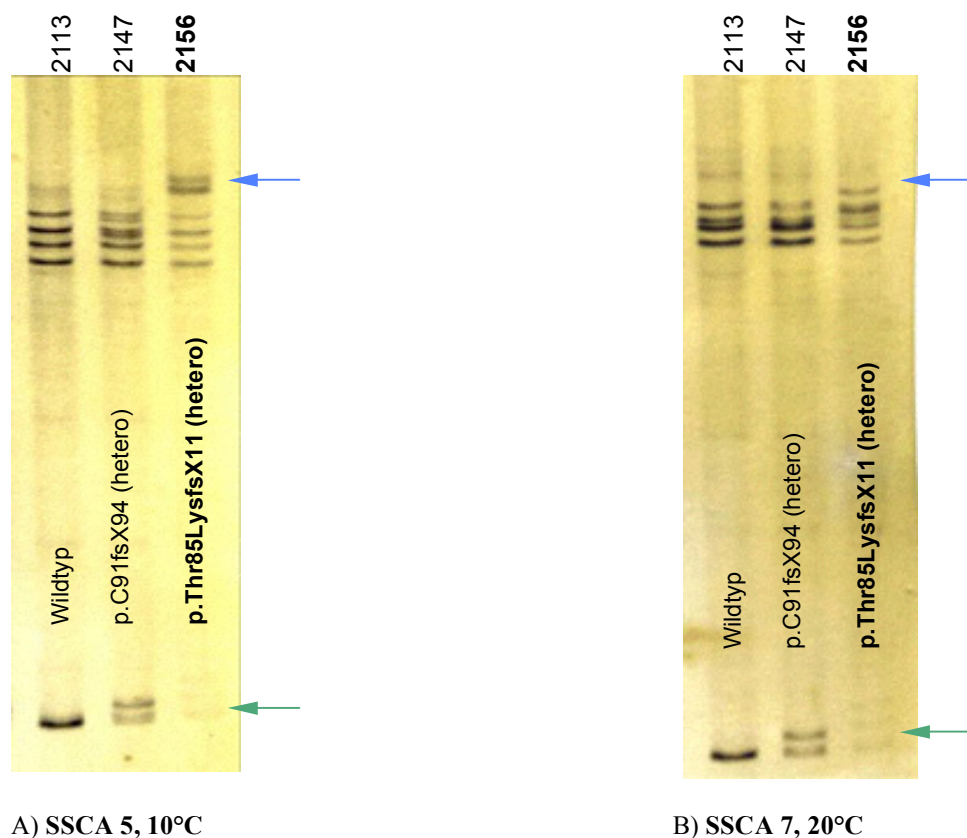
Patient	Genotyp	Polydaktylie	Adipositas	Retinitis pigmentosa
2031	WT/p.Cys91LeufsX5	—	✓	✓
2040	WT/p.Cys91LeufsX5	nb	nb	nb
2055	WT/p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2105	WT/p.Cys91LeufsX5	nb	nb	nb
2147	WT/p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2211	WT/p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2233	WT/p.Cys91LeufsX5	✓	✓	—
2046	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	nb	nb	nb
2104	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2109	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2138	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2151	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2165	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓
2221	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	nb	nb	nb
2222	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	—
2238	p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	✓	✓	✓

WT=Wildtyp-Allel, p.Cys91LeufsX5=mutantes Allel, ✓= Merkmal vorhanden, —= Merkmal fehlt, nb= nicht bekannt

4.2.2 Mutationsanalyse für [c.253_254insA; c.254C>G] (p.Thr85LysfsX11)

In der SSCA war eine dritte Einzelstrang-Konformation aufgefallen (Variante 3). Das Laufverhalten der DNA-Fragmente der Patientin 2156 war nicht mit den übrigen Fragmentmustern vergleichbar, sowohl bei 10°C als auch bei 20°C waren zusätzliche Banden in der Einzelstrang-Konformationen sichtbar (Abb. 4.2-10).

In der Doppelstrang-Sequenzierung war die Reverse-Sequenz nicht zu interpretieren, während die Forward-Sequenz ab cDNA-Position 253 unlesbar wurde (Abb. 4.2-11). Um genau zu analysieren, was für eine Art von Sequenzveränderung hier vorliegt, wurde mithilfe von TOPO TA Cloning® eine Einzelstrang-Sequenzierung angefertigt. Als Kontrolle diente hierbei die homozygote Wildtypsequenz (WT/WT) des Patienten 2197 (Abb. 4.2-11).



A) SSCA 5, 10°C

B) SSCA 7, 20°C

Abbildung 4.2-10: SSCA *BBS10*-Exon 2, PAA-Gel 12%, A: 10°C / B: 20°C

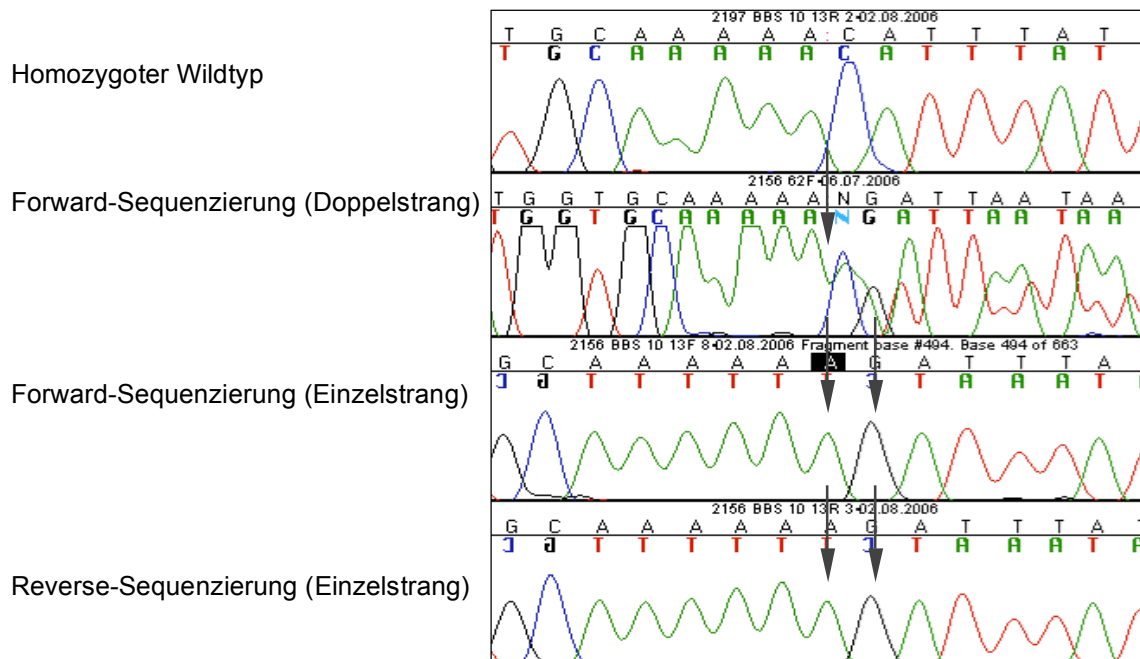


Abbildung 4.2-11: Heterozygoter Genotyp mit der Sequenzveränderung [c.253_254insA; c.254C>G] in *BBS10* Exon 2, die auf Proteinebene zur Mutation p.Thr85LysfsX11 führt (Patientin 2156)
 Doppel- und Einzelstrang-Sequenzierung der Probe 2156, die in der SSCA ein individuelles Laufverhalten zeigte. Zum Vergleich ist der homozygote Wildtyp (Patient 2197) mit dargestellt.

In der Einzelstrang-Sequenzierung waren auf einem Allel zwei Veränderungen festzustellen. Zwischen den Nukleotiden c.253 und c.254 ist eine zusätzliche Base Adenin eingefügt (c.253_254insA), des Weiteren ist Cytosin an Stelle 254 durch Guanin substituiert (c.254C>G). Insgesamt wird diese Sequenzveränderung mit der Formel [c.253_254insA, c.254C>G] beschrieben. Im Protein resultiert ein Aminosäureaustausch an Position 85 von Threonin durch Lysin. Dadurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung und 11 Aminosäuren strangaufwärts zu einem verfrühten Stopp-Kodon an Position 95 im Protein. Diese Proteinveränderung wird definiert durch p.Thr85LysfsX11 und ist im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben (Claus et al. 2007).

Im Phänotyp zeigt die Patientin mit dem heterozygoten Genotyp (WT/p.Thr85LysfsX11) eine Polydaktylie, Adipositas und eine Retinitis pigmentosa. Sie weist demnach mindestens drei der sechs klinischen Hauptmerkmale des BBS auf. Aufgrund des stark ausgeprägten BBS-Phänotyps ist davon auszugehen, dass weitere Mutationen in *BBS10* oder anderen *BBS*-Genen vorliegen. In *BBS1* ließ sich bei dieser Patientin keine Sequenzveränderung nachweisen.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zu *BBS10*

Bei der Sequenzanalyse von *BBS10* wurden zwei verschiedene Mutationen gefunden, die getrennt auftraten (Tab. 4.2-5). Am häufigsten ist mit 21,1% die Mutation p.Cys91LeufsX5 bei 16 von 76 Patienten vertreten. Darunter sind 9,2% (7/76) heterozygote und 11,8% (9/76) homozygote Mutationsträger. Die Allelfrequenz für p.Cys91LeufsX5 liegt bei 16,4% (25/152). Die Mutation p.Thr85LysfsX11 (heterozygoter Genotyp) ließ sich bei einer von 76 Patienten nachweisen. Es fanden sich bei der Mutationssuche in *BBS10* insgesamt 17 Mutationsträger, dies macht einen Anteil von 22,4% (17/76) aus.

Mit Ausnahme einer Patientin mit homozygotem Genotyp von p.Cys91LeufsX5 sind alle Patienten, bei denen eine Mutation in *BBS10* nachweisbar war, deutscher Herkunft. Insgesamt befinden sich unter den deutschen BBS-Patienten also 29,6% (16/54) Mutationsträger in *BBS10*. Bei 27,8% (15/54) der deutschen BBS-Patienten ist dabei der hetero- oder homozygote Genotyp von p.Cys91LeufsX5 vorhanden.

Zum Vergleich sind in Tabellen 4.2-6 und 4.2-7 die international publizierten Ergebnisse zur Mutationsanalyse in *BBS10* aufgeführt (Stoetzel et al. 2006). Dabei wird deutlich, dass in dieser Studienpopulation die Mutation p.Cys91LeufsX5 häufiger auftrat, und dass die Mutation p.Thr85LysfsX11 bisher noch nicht in der Literatur beschrieben ist.

Tabelle 4.2-5: Sequenzvariationen in *BBS10* bei 76 Patienten der Studienpopulation

Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
WT/WT	58/76	76,3%	76,3%
WT/p.Cys91LeufsX5	7/76	9,2%	16,4%
p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5	9/76	11,8%	
WT/p.Thr85LysfsX11	1/76	1,3%	0,7%

WT=Wildtyp-Allel, benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

Tabelle 4.2-6: Ergebnisse der Mutationsanalyse in *BBS10* bei 311 Patienten (Stoetzel et al. 2006)

Exon	Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
<i>BBS10</i> gesamt	WT/WT	246/311	79,1%	79,1%
	WT/MUT	65/311	20,9%	19,0%
	MUT/MUT			
2	WT/ p.Cys91LeufsX5	40/311	12,9%	9,3%
	p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5			
<i>BBS10</i> gesamt	Andere Mutationen in <i>BBS10</i>	25/311	8,0%	9,6%

WT=Wildtyp-Allel, MUT und benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

Tabelle 4.2-7: Sequenzvariationen in *BBS10* (Stoetzel et al. 2006)

Es handelt sich überwiegend Aminosäureaustauschmutationen und Stoppmutationen.

Exon	Mutation	Exon	Mutation	Exon	Mutation
1	p.A13fsX81	2	p.C91W	2	p.S329L
1	p.R34P	2	p.C91fsX95	2	p.L348fsX360
1	p.R49W	2	p.L170S	2	p.P363L
1	p.K57R	2	p.C195W	2	p.L367fsX368
1	p.S73fsX91	2	p.Y197C	2	p.L414S
		2	p.F199del	2	p.A474fsX483
		2	p.V230fsX236	2	p.T483fsX490
		2	p.V240G	2	p.T514fsX523
		2	p.Q242fsX258	2	p.Y559fsX576
		2	p.K243fsX258	2	p.Y613C
		2	p.F275fsX281	2	p.Y613H
		2	p.S303fsX305	2	p.G677V
		2	p.L308F	2	p.T689P
		2	p.S311A	2	p.V707fsX708
		2	p.Y321X		

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der umfassenden Auswertung aller Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass nicht bei allen 76 Patienten sämtliche Analysen durchgeführt werden konnten (Tab. 4.3-1). Zur Genotypisierung von p.Met390Arg liegen Ergebnisse von 75/76 Patienten vor. Eine Patientin türkischer Herkunft konnte nicht berücksichtigt werden, weil bei ihr eine Deletion der Exons 12-13 besteht (c.Ex12_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). In der SSCA sind Ergebnisse zu 72/76 Patienten erhoben worden. Vier Patienten konnten nicht in die SSCA mit eingeschlossen werden, da ihre Blutproben erst eintrafen, als diese Untersuchung bereits abgeschlossen war. Die Sequenzierung des 214bp langen PCR-Produkts von c.62_275 im Exon 2 von *BBS10* wurde bei allen 76/76 Patienten der Studienpopulation durchgeführt.

Tabelle 4.3-1: Aufgliederung der 76 Patienten der Studienpopulation nach der jeweilig durchgeführten Untersuchung

Gen	Untersuchung	Anzahl der analysierten Patienten	Herkunft
BBS1	Genotypisierung von p.Met390Arg in <i>BBS1</i>	75	54 Deutschland 12 Türkei 9 andere
	SSCA von zehn Exons in <i>BBS1</i>	72	53 Deutschland 13 Türkei 6 andere
BBS10	Genotypisierung von p.Cys91LeufsX5 in <i>BBS10</i>		54 Deutschland
	Sequenzierung von Exon 2 in <i>BBS10</i>	76	13 Türkei 9 andere

4.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Mutationen p.Met390Arg (*BBS1*) und p.Cys91LeufsX5 (*BBS10*)

Die beiden häufigsten Mutationen bei BBS-Patienten sind p.Met390Arg in *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 in *BBS10*. Sie waren nie gemeinsam in einem Individuum zu beobachten. Die Punktmutation p.Met390Arg war mit 10,7% (8/75) bei mindestens jedem zehnten BBS-Patienten zu finden und die Rasterschubmutation p.Cys91LeufsX5 trat mit 21,1% (16/76) bei mehr als jedem fünften BBS-Patienten auf (Tab. 4.3-2). Allein mit der Genotypisierung von p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 kann also in diesem Patientenkollektiv rund ein Drittel klinisch diagnostizierter BBS-Patienten (31,7%) molekulargenetisch erfasst werden.

Schließt man nur die Patienten deutscher Herkunft mit ein (54/76), so erhöht sich der Anteil von Trägern der häufigsten BBS-Mutationen auf 42,6% (23/54) (Tab. 4.3-1 und 4.3-5). Bei 14,8% (8/54) der deutschen BBS-Patienten wurde die Aminosäureaustauschmutation p.Met390Arg in hetero- oder homozygoter Form nachgewiesen. Bei 27,8% (15/54) von ihnen fand sich ein hetero- oder homozygoter Genotyp mit der Rasterschubmutation p.Cys91LeufsX5 (Tab. 4.3-5).

Tabelle 4.3-2: Häufigkeitsverteilung der Mutationen p.Cys91LeufsX5 und p.Met390Arg bei 76 Patienten

Genotyp	Patienten	%	Allelfrequenz
WT/WT	51/76	67,1%	67,1%
WT/p.Met390Arg	2/75	2,7%	9,3%
p.Met390Arg/p.Met390Arg	6/75	8,0%	
WT/p.Cys91LeufsX5	7/76	9,2%	16,4%
p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5	9/76	11,8%	

WT=Wildtyp-Allel, benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

4.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der gesamten Mutationsanalyse in *BBS1* und *BBS10*

Berücksichtigt man neben p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 auch alle anderen Mutationen, die in dieser Studie in *BBS1* und *BBS10* analysiert werden konnten, so fanden sich 29 Mutationsträger (29/76, 38,2%). Dies sind rund 40% aller Patienten der Studiengruppe (Tab. 4.3-3 und 4.3-4). Sie gliedern sich auf in 13 heterozygote und 16 homozygote Mutationsträger. Es konnten bei keinem Patienten Mutationen in *BBS1* und in *BBS10* gefunden werden, es waren jeweils nur Allele in einem Genort mutant.

Tabelle 4.3-3: Mutationen in *BBS1*

Genotyp	Patienten	Herkunft	%	Allelfrequenz
WT/ p.Met390Arg	2/75	Deutschland	10,7%	9,3%
p.Met390Arg / p.Met390Arg	6/75			
c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del	1/72	Türkei	5,6%	4,2%
p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr	1/72	Deutschland		
WT/p.Arg440X	1/72	Deutschland		
WT/p.Ser554Cys	1/72	Türkei		

WT=Wildtyp-Allel, benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

Tabelle 4.3-4: Mutationen in *BBS10*

Genotyp	Patienten	Herkunft	%	Allelfrequenz
WT/ p.Cys91LeufsX5	7/76	Deutschland	21,1%	16,4%
p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5	9/76	8 Deutschland 1 Türkei		
WT/p.Thr85LysfsX11	1/76	Deutschland	1,3%	0,7%

WT=Wildtyp-Allel, benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

Berechnet man nur die Ergebnisse der deutschen Patienten dieser Studie, so ließ sich bei 48,1% (26/54) eine Mutation in *BBS1* oder *BBS10* nachweisen. Zehn Patienten tragen mindestens ein mutantes Allel in *BBS1* (10/54) und 16 Patienten sind hetero- oder homozygote Mutationsträger in *BBS10* (16/54).

Unter den 13 türkischen Patienten befinden sich drei Mutationsträger (23,1%, 3/13). Ein Patient ist heterozygoter Träger einer Punktmutation p.Ser554Cys im Exon 16 von *BBS1*, die zweite Patientin trägt den homozygoten Genotyp einer Deletion von Exon12-13 in *BBS1*. Eine dritte Patientin ist homozygote Mutationsträgerin von p.Cys91LeufsX5 in *BBS10*.

Bei Patienten, die anderer als deutscher oder türkischer Herkunft sind, wurde keine Mutation nachgewiesen (9/76).

Eine epidemiologisch gegliederte Auflistung der Häufigkeitsverteilungen von Mutationen in *BBS1* und *BBS10* bietet die Tabelle 4.3-5.

Tabelle 4.3-5: Aufgliederung der Ergebnisse zur Mutationsanalyse in *BBS1* und *BBS10*

	Deutschland		Türkei		andere		insgesamt	
	Patienten	Allele	Patienten	Allele	Patienten	Allele	Patienten	Allele
WT/p.Met390Arg	2/54 3,70%	2/108 1,85%	0/12 0,00%	0/24 0,00%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	2/75 2,67%	2/150 1,33%
p.Met390Arg/ p.Met390Arg	6/54 11,11%	12/108 11,11%	0/12 0,00%	0/24 0,00%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	6/75 8,00%	12/150 8%
p.Met390Arg- Mutationsträger	8/54 14,81%	14/108 12,96%	0/12 0,00%	0/24 0,00%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	8/75 10,67%	14/150 9,33%
WT/p.Cys91LeufsX5	7/54 12,96%	7/108 6,48%	0/13 0,00%	0/26 0,00%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	7/76 9,21%	7/152 4,6%
p.Cys91LeufsX5/ p.Cys91LeufsX5	8/54 14,81%	16/108 14,81%	1/13 7,69%	2/26 7,69%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	9/76 11,84%	18/152 11,84%
p.Cys91LeufsX5- Mutationsträger	15/54 27,78%	23/108 21,30%	1/13 7,69%	2/26 7,69%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	16/76 21,05%	25/152 16,45%
p.Met390Arg- und p.Cys91LeufsX5- Mutationsträger	23/54 42,59%	37/108 34,26%	1/13 7,69%	2/26 7,69%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	24/76 31,58%	39/152 25,66%
Andere Mutationen in <i>BBS1</i>	2/53 3,77%	3/106 2,83%	2/13 15,38%	3/26 11,54%	0/6 0,00%	0/12 0,00%	4/72 5,56%	6/144 4,17%
Andere Mutationen in <i>BBS10</i>	1/54 1,85%	1/108 0,93%	0/13 0,00%	0/26 0,00%	0/9 0,00%	0/9 0,00%	1/76 1,32%	1/152 0,7%
Mutationsträger in <i>BBS1</i> oder <i>BBS10</i>	26/54 48,15%	41/108 37,96%	3/13 23,08%	5/26 19,23%	0/9 0,00%	0/18 0,00%	29/76 38,16%	46/152 30,26%

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Angewandte Methoden

In dieser Studie wurde bei 76 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft eine Mutationssuche in den Kandidatengen *BBS1* und *BBS10* durchgeführt.

Mit dem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Enzymverdau durch die Restriktionseendonuklease *AvaII* fand im *BBS1*-Gen eine Genotypisierung der Mutation p.Met390Arg statt (Abb. 2.5-5). Zur weiteren Mutationssuche in *BBS1* wurde eine Einzelstrang-Konformations-Analyse (single-strand conformational analysis, SSCA) von zehn der insgesamt 17 Exons des Gens durchgeführt (Exon 4, 5, 7-10, 12, 13, 15 und 16). Bei Patienten, die ein auffälliges Fragmentmuster boten, fand eine Sequenzanalyse statt, um das Ergebnis zu spezifizieren.

In *BBS10* wurde die Mutationssuche mit einer direkten Sequenzanalyse des 214bp umfassenden PCR-Produkts des Exons 2 realisiert, welches über 90% der kodierenden Gensequenz einnimmt. Bei einer zuvor durchgeführten SSCA konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Mit den angewandten Methoden wurden repräsentative Daten zur Häufigkeitsverteilung von *BBS*-Mutationen erhalten. Es werden dabei erstmals Berechnungen zur Frequenz von p.Met390Arg in *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 in *BBS10* innerhalb eines Patientenkollektivs angestellt. Außerdem sind Aussagen zum digenen und oligogenen Vererbungsmodus möglich, da zu dem Marburger Patientenkollektiv molekulargenetische Ergebnisse von *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* vorliegen.

5.1.2 SSCA und direkte Sequenzanalyse

Die SSCA und die direkte Sequenzanalyse sind geeignete Methoden zur Suche nach Sequenzvarianten in Kandidatengen. Im Vergleich gewährleistet die direkte Sequenzanalyse eine größere Sensitivität und Spezifität als die SSCA. Jedoch ist der zeitliche und finanzielle Aufwand einer direkten Sequenzanalyse sehr viel höher. Deshalb muss bei jeder molekulargenetischen Analyse individuell abgewogen werden, welche Methode eingesetzt werden soll.

Bei der Untersuchung einer großen Anzahl von DNA-Proben ist die SSCA der direkten Sequenzierung zunächst vorzuziehen. Durch eine Selektion potentieller Mutationsträger minimiert sie die Anzahl der zu sequenzierenden Proben. Die Sequenzanalyse dient in

diesem Zusammenhang nicht mehr der umfangreichen Mutationssuche. Ihre Aufgabe ist es vielmehr, bei den aberranten Fragmentmustern zwischen unspezifischen Einzelstrang-Konformationen und tatsächlichen Sequenzvarianten zu unterscheiden, deren Lage und Art sie zu bestimmen hat.

Die SSCA besitzt jedoch auch Nachteile. Eine Standardisierung methodischer Abläufe ist wegen der vielen äußeren Einflüsse schwer zu realisieren. Dadurch sind die Ergebnisse nicht immer reproduzierbar (Abb. 4.1-13 und 4.1-33). Zudem beträgt die Sensitivität der SSCA maximal 80%, sodass trotz sorgfältigster Etablierung und optimaler Durchführung mindestens 20% der Mutationsträger nicht erfasst werden (Sheffield et al. 1993). Durch unspezifische DNA-Fragmente und eine manchmal geringe Ausbeute bei der PCR-Amplifizierung werden die Fragmentmuster im Polyacrylamidgel (PAA-Gel) unscharf und verhindern eine differenzierte Zuordnung (Abb. 4.1-2 und 4.1-3). So können Mutationsträger übersehen werden. Weiterhin rufen manche Mutationen keine abnorme Einzelstrang-Konformation hervor, sodass die dazugehörigen Mutationsträger nicht detektiert werden. Beim heterozygoten Genotyp großer Deletionen tritt dieses Problem auf, da in der SSCA nur das Fragmentmuster des Wildtyp-Allels sichtbar wird. Umgekehrt ist die SSCA auch nicht ausreichend sensitiv, um die Insertion oder Deletion eines einzigen Basenpaares bei homozygotem Genotyp zu erfassen. Hier ist nur der heterozygote Genotyp vom Wildtyp differenzierbar, da zwei verschiedene Einzelstränge im PAA-Gel aufgetrennt sind, sodass gut erkennbare Doppelbanden entstehen (Abb. 4.2-4). Dieses Phänomen zeigt sich zum Beispiel bei der SSCA des Exons 2 in *BBS10*. Die DNA-Fragmente mit homozygotem Genstatus der Rasterschubmutation p.Cys91LeufsX5 sind trotz eines klaren und reichlich amplifizierten PCR-Produkts nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 4.2-2 bis 4.2-5).

Da die Mutation p.Cys91LeufsX5 sehr häufig auftritt und homozygote Mutationsträger nicht vernachlässigt werden dürfen, wurde keine SSCA zur Mutationssuche in *BBS10* eingesetzt, sondern die direkte Sequenzanalyse des PCR-Produkts vom Exon 2 (214bp; Tab.2.3-4). Diese Nachweismethode ist sensitiver und spezifischer. Es konnten in der direkten Sequenzanalyse 17 Mutationsträger detektiert werden (Tab. 4.3-4), wovon in der SSCA nur acht erkennbar gewesen waren. Die Sensitivität der SSCA für Sequenzvarianten in *BBS10* liegt folglich nur bei 47,1% (8/17) und daher ist diese Methode zur Mutationssuche in *BBS10* ungeeignet.

Hierbei wird die Frage aufgeworfen, ob bei der molekulargenetischen Analyse von *BBS1* vielleicht auch Mutationen nicht gefunden worden sind. Ausschließen lässt sich diese Möglichkeit nicht, jedoch ist die SSCA grundsätzlich eine gut etablierte Methode zur Mutationssuche in *BBS1* (Mykytyn et al. 2003). In Tabelle 5.1-1 werden die Ergebnisse der SSCA-Mutationssuche in dieser Studie mit Ergebnissen aus der Literatur verglichen, die durch eine direkte Sequenzanalyse erhoben wurden (Beales et al. 2003).

Dabei wird deutlich, dass die mit der SSCA erzielten Resultate durchaus repräsentativ sind. Zwar können Beales und Mitarbeiter insgesamt mehr mutante Allele entdecken, jedoch ist dies neben einer höheren Sensitivität der Methode auch durch eine größere Studiengruppe bedingt.

Letztendlich kommt eine direkte Sequenzanalyse des gesamten *BBS1*-Gens mit einer cDNA über 3370bp (NM_024649.4) in der Routine-Diagnostik aus Kostengründen nicht in Frage. Es bleibt daher zurzeit nur die SSCA zur umfassenden Mutationssuche in *BBS1*. Eine alternative Möglichkeit böte die Entwicklung eines Microarray-Systems (oder auch Gene-Chip), wie es von anderen Arbeitsgruppen bereits angewandt wird (Stoetzel et al. 2007).

Tabelle 5.1-1: Vergleich der Ergebnisse einer direkten Sequenzanalyse mit Ergebnissen einer SSCA

Genotyp		Allelfrequenz	
		Beales et al.2003 Direkte Sequenzanalyse	Marburg SSCA+Sequenzierung
BBS1 gesamt	WT/WT	76,8%	83,3%
	WT/MUT		
	MUT/MUT	21,4%	13,9%
Exon 12	WT/p.Met390Arg		
	p.Met390Arg/p.Met390Arg	14,3%	9,3%
BBS1 gesamt	Andere Mutationen in <i>BBS1</i>	7,1%	4,2%

WT=Wildtyp-Allel, MUT und benannte Mutationen stehen für ein mutantes Allel

5.1.3 Screening-Methoden zur Mutationssuche bei BBS-Patienten

Für ein Screening-Programm werden klar definierte Screening-Parameter benötigt. Des Weiteren müssen die Methoden, welche zu ihrem Nachweis angewandt werden, ausreichend sensitiv und spezifisch sein sowie eine günstige Relation von Aufwand und Nutzen besitzen. Ein Screening-Programm setzt außerdem voraus, dass seine Durchführung ethisch akzeptabel ist.

Die Diagnose des BBS wird nach klinischen Kriterien gestellt, weil bislang kein geeigneter Parameter zum labortechnischen Nachweis dieses Syndroms zur Verfügung steht (Tab. 1.3-1). Ein Mutations-Screening bei klinisch diagnostizierten BBS-Patienten muss sich daher auf den Nachweis häufig beobachteter Mutationen in der Studienpopulation beschränken. In der internationalen Literatur fand sich die Mutation p.Met390Arg (Exon 12, *BBS1*) bei 18,1% und die Mutation p.Cys91LeufsX5 (Exon 2, *BBS10*) bei 12,9% der BBS-Patienten (Beales et al. 2003; Stoetzel et al. 2006). Da dies sehr hohe Frequenzen sind, lohnt es sich, ein Screening-Programm durchzuführen, welches gezielt nur nach diesen beiden Mutationen sucht. Alle anderen bisher beim BBS bekannten

Mutationen treten sehr viel seltener auf, sodass sich nicht ausreichend Patienten damit genotypisieren ließen und der Aufwand eines Screenings zu hoch wäre.

Für die Genotypisierung der Punktmutation p.Met390Arg (Exon 12, *BBS1*) wurde in dieser Arbeitsgruppe ein Enzymverdau durch die *AvaII*-Restriktionsendonuklease etabliert (Abb. 2.5-5) (Frick 2007). Auch in der SSCA lässt sich diese Mutation zuverlässig nachweisen (Abb. 4.1-28). Jedoch ist der Enzymverdau als Screening-Methode vorzuziehen, da der Arbeits- und Zeitaufwand hierbei wesentlich geringer ist und das Ergebnis sich besser interpretieren lässt. Er ist die Methode der Wahl zum Testen auf die Mutation p.Met390Arg. In der Studienpopulation liegt bei 10,7% (8/75) der Patienten die Mutation p.Met390Arg in homo- und heterozygoter Form vor, dies entspricht einer Allelfrequenz von 9,3% (14/150) (Tab. 4.3-3 und 4.3-5).

Der Genotyp der Rasterschubmutation p.Cys91LeufsX5 (Exon 2, *BBS10*) ist nur mit Hilfe einer direkten Sequenzierung des 214bp langen PCR-Produkts vom Exon 2 in *BBS10* analysierbar (Tab. 2.3-4). Es ließ sich so bei 21,1% (16/76) der Patienten p.Cys91LeufsX5 in homo- oder heterozygoter Form nachweisen, die Allelfrequenz beträgt 16,4% (25/152) (Tab. 4.3-4 und 4.3-5). Zwar ist die direkte Sequenzierung von wirtschaftlicher Seite her nicht als Screening-Methode anzusehen, jedoch stehen aktuell keine alternativen Möglichkeiten zur Auswahl. Die SSCA erwies sich als ungeeignet, weil der homozygote Genotyp der Mutation p.Cys91LeufsX5 dabei nicht detektiert werden kann. Für einen Enzymverdau ließ sich keine Schnittstelle finden, welche die verschiedenen Genotypen zu unterscheiden vermag.

5.2 Die Funktion der BBS-Gene

Die molekularbiologischen Zusammenhänge zur Pathophysiologie des Bardet-Biedl-Syndroms sind noch nicht komplett aufgeschlüsselt. Es konnten bisher 12 Gene identifiziert und mit einer Zilienfunktion assoziiert werden. Jedoch resultieren die aktuellen pathophysiologischen Erkenntnisse alle aus Versuchen mit Tiermodellen wie zum Beispiel *Mus musculus* (Hausmaus), *C.elegans* (Wurmart) und *Danio rerio* (Zebrafisch). Experimentelle Daten zum menschlichen Organismus, *Homo sapiens*, liegen derzeit noch nicht vor. Die aktuellen Vermutungen über putative Funktionen der BBS-Gene setzen sich daher aus organisch inhomogenen Ergebnissen zusammen. Sie basieren auf einem idealisierten pathophysiologischen Modell, in dem bislang kein lückenloser Zusammenhang zwischen Gendefekt und Syndrommanifestation hergestellt werden kann. In der Regel wird die Funktion von Genprodukten auf drei Ebenen beschrieben, der biochemischen, der zellulären und der organischen Ebene. Für die Genprodukte der BBS-Genloci sind nur bruchstückhafte Informationen auf jeder dieser Ebenen vorhanden.

Auf biochemischer Ebene können einzelne Strukturen und Domänen spezifiziert werden, wodurch sich die analysierten BBS-Genprodukte bestimmten Proteinfamilien zuordnen lassen (Tab. 1.5-1). Man weiß zum Beispiel über das Genprodukt von *BBS1*, dass es eine Protein-Domäne mit β -Propellerform besitzt (Badano et al. 2003a). Das Genprodukt von *BBS10* wird zur Familie der Chaperone gezählt (Stoetzel et al. 2006). Genauer ist die Funktion der Genprodukte bislang noch nicht festzulegen. Der biologische Effekt einer Mutation ist deshalb nicht vorauszusagen. Nur die Häufigkeitsverteilung der Mutationen bei Patienten kann beschrieben werden.

Auf zellulärer Ebene ist bekannt, dass alle BBS-Proteine im Basalkörper von Zilien lokalisiert sind (Beales 2005). Das Zusammenspiel der BBS-Proteine ist essentiell für physiologische Funktionsabläufe im Zilienapparat, jedoch sind die dazugehörigen Reaktionswege noch nicht analysiert. Die funktionellen Aufgaben der einzelnen BBS-Proteine sind unklar und folglich lässt sich nicht einschätzen, welche Konsequenzen der isolierte Ausfall eines BBS-Proteins hat. Es ist vorstellbar, dass bestimmte Proteinveränderungen kompensiert werden können, da sie keine wesentliche Voraussetzung für den Reaktionsablauf bilden. Sicherlich existieren aber auch BBS-Proteine, die eine unerlässliche Schlüsselfunktion für die Aufrechterhaltung der Zilienfunktion übernehmen. Hier könnten schon minimale Abweichungen zum Ausfall des Gesamtsystems führen. Welche Relevanz ein Funktionsverlust des *BBS1*- oder des *BBS10*-Gens für die Ausprägung des Bardet-Biedl-Syndroms hat, ist daher unklar.

Die organische Ebene beschreibt die Auswirkungen der Genprodukte auf den Organismus. Funktionseinschränkungen der BBS-Genprodukte stehen in Verbindung mit einer Zilien-Pathologie, die zu den phänotypischen Merkmalen des BBS führt (Tab. 1.5-2). Die genaue Pathogenese aber lässt sich nicht rekonstruieren, solange die BBS-Genprodukte auf biochemischer und zellulärer Ebene nicht vollständig charakterisiert sind. Möglicherweise handelt es sich bei einigen BBS-Genen um Entwicklungsgene. Sie wären dann vermutlich an zilienassoziierten Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt. Ein Funktionsverlust könnte zu Dysmorphien der Gliedmaßen führen, wie zum Beispiel einer postaxialen Polydaktylie. Ebenso könnten BBS-Proteine aber auch an speziellen Reaktionen des intraflagellaren Transports im Zilium teilhaben (Ou et al. 2005). Bei Fehlfunktionen von Zilienstrukturen in den Photorezeptoren der Netzhaut käme es zu einer progressiven retinalen Degeneration, die eine altersabhängig auftretende Retinitis pigmentosa provoziert (Eley et al. 2005).

5.3 Mutationen in den Genen *BBS1* und *BBS10*

5.3.1 p.Met390Arg in *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 in *BBS10*

Mindestens 12 Genloci tragen zur Ausprägung des BBS bei (Tab. 1.4-1). Am häufigsten lassen sich die pathogenen Mutationen p.Met390Arg im Exon 12 von *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 im Exon 2 von *BBS10* nachweisen. In der Literatur wird für die Punktmutation p.Met390Arg bei BBS-Patienten eine Auftretshäufigkeit von 18,1% und eine Allelfrequenz von 14,3% beschrieben (Tab.5.3-1) (Beales et al. 2003). Die Raster-schubmutation p.Cys91LeufsX5 lässt sich nach den international berechneten Werten bei 12,9% der BBS-Patienten mit einer Allelfrequenz von 9,3% nachweisen (Tab. 5.3-2) (Stoetzel et al. 2006). Hierbei ist zu erwähnen, dass in der Publikation von Stoetzel und Mitarbeitern eine andere Nomenklatur als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die Mutation p.Cys91LeufsX5 wird dort mit der Formel C91fsX95 bezeichnet (Stoetzel et al. 2006).

In der vorliegenden Studie findet sich die Mutation p.Met390Arg bei 10,7% (8/75) der Patienten. Davon sind 2,7% (2/75) heterozygote und 8,0% (6/75) homozygote Mutationsträger. Die Allelfrequenz für die gesamte Studienpopulation liegt bei 9,3% (14/150) (Tab. 4.3-2 und 4.3-5). Alle p.Met390Arg-Mutationsträger stammen aus Deutschland (8/54; 14,8%), sodass die Allelfrequenz für die deutsche Population 13,0% (14/108) beträgt. Bei den türkischen Patienten und den Patienten anderer Herkunft lässt sich kein Träger der Mutation p.Met390Arg feststellen (Tab. 5.3-1 und 4.3-5).

Die *BBS10*-Mutation p.Cys91LeufsX5 kann bei 21,1% (16/76) der Patienten nachgewiesen werden. Darunter sind 9,2% (7/76) heterozygote und 11,8% (9/76) homozygote Mutationsträger. Die Allelfrequenz in der gesamten Studienpopulation beträgt 16,4% (25/152) (Tab. 4.3-2 und 4.3-5). Bis auf eine homozygote p.Cys91LeufsX5-Mutationsträgerin türkischer Herkunft findet sich p.Cys91LeufsX5 ebenfalls nur bei deutschen Patienten (15/54; 27,8%). Die Allelfrequenz in der deutschen Population liegt bei 21,3% (23/108). In anderen Populationen als denen aus Deutschland und der Türkei ist im Rahmen dieser Studie kein mutantes Allel zu finden (Tab. 5.3-2 und 4.3-5).

Die Mutationen p.Met390Arg in *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 in *BBS10* treten in keinem Individuum der Studienpopulation in Kombination auf, sondern sind nur einzeln zu beobachten. Bei einer Genotypisierung von p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 sind daher insgesamt 31,6% (24/76) Mutationsträger unter den BBS-Patienten detektierbar (Tab. 4.3-5). Am häufigsten sind p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 mit einer Allelfrequenz von 34,3% (37/108) in der deutschen Population zu finden. Mit ihrer Genotypisierung kann demnach bei 42,6% (23/54) der deutschen BBS-Patienten die klinische Diagnose des BBS molekulargenetisch bestätigt werden (Tab. 5.3-1, 5.3-2 und 4.3-5).

Bei Patienten türkischer Herkunft lässt sich ein mutantes Allel für die Mutation p.Cys91LeufsX5 dreimal seltener als bei deutschen Patienten feststellen (2/26; 7,7%), während die Mutation p.Met390Arg bei ihnen gar nicht auftritt. Bei Patienten, die anderer als türkischer oder deutscher Herkunft sind (zwei Australier, ein Kanadier, ein Araber, ein Brasilianer, ein Bosnier, ein Rumäne, ein Italiener und ein Niederländer), lassen sich keine der beiden Mutationen nachweisen (Tab. 5.3-1 und 5.3-2).

Tabelle 5.3-1: Häufigkeit der p.Met390Arg-Mutation in *BBS1* im Vergleich zu den Ergebnissen von Beales et al. 2003

<i>BBS1</i>	Beales et al. 2003	Marburg		
Population	USA und England	Deutschland	Türkei	andere
Patientenzahl	259	54	12	9
p.Met390Arg-Mutationsträger	47 18,1%	8 14,8%	0 0	0 0
p.Met390Arg-Allele	74	14	0	0
Allelfrequenz	14,3%	13,0%	0,0%	0,0%

Tabelle 5.3-2: Häufigkeit p.Cys91LeufsX5 -Mutation in *BBS10* im Vergleich zu den Ergebnissen von Stoetzel et al. 2006

<i>BBS10</i>	Stoetzel et al. 2006	Marburg		
Population	Kaukasus, Afghanistan, Türkei, Zigeuner	Deutschland	Türkei	andere
Patientenzahl	311	54	13	9
p.Cys91LeufsX5-Mutationsträger	40 12,9%	15 27,8%	1 7,7%	0 0
p.Cys91LeufsX5-Allele	58	23	2	0
Allelfrequenz	9,3%	21,3%	7,7%	0,0%

Es zeigen sich geringe Differenzen zu den Daten der Literatur. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Anzahl der Patienten dieser Studie wesentlich geringer ist als in den aufgeführten internationalen Vergleichsstudien. Es unterscheidet sich auch die epidemiologische Zusammensetzung der jeweiligen Patientenkollektive.

Die Mutation p.Met390Arg lässt sich in der hier analysierten Gesamtstudienpopulation etwas seltener beobachten als in der gemischt englisch-amerikanischen Population, die von Beales und Mitarbeitern vorgestellt wird (Tab. 4.3-2, 4.3-5 und 5.3-1) (Beales et al. 2003). Bei einer isolierten Betrachtung der deutschen Population bestätigt sich jedoch die von ihnen berechnete Allelfrequenz (Tab. 5.3-1). Vermutlich sind BBS-Patienten nordeuropäischer und nordamerikanischer Herkunft ähnlich häufig Träger von p.Met390Arg. In anderen Populationen, wie zum Beispiel der türkischen, ist das Vorkommen von p.Met390Arg sehr viel seltener. Durch die heterogene deutsch-türkische

Studienpopulation kommt es daher zu einer insgesamt niedrigeren Allelfrequenz als in der Studie von Beales und Mitarbeitern (Beales et al. 2003).

Interessante Ergebnisse zeigen sich auch zu der Allelfrequenz von p.Cys91LeufsX5. Im Vergleich zu der von Stoetzel und Mitarbeitern erfassten Allelfrequenz von 9,3%, trat das mutante Allel in der hier untersuchten Gesamtstudienpopulation mit einer deutlich höheren Frequenz auf (Stoetzel et al. 2006). Dabei beträgt die Allelfrequenz in der deutschen Population 21,3% (23/108) und bei Patienten türkischer Abstammung 7,7% (2/26) (Tab. 4.3-2, 4.3-5 und 5.3-2). Die von Stoetzel und Mitarbeitern publizierte Frequenz bezieht sich auf eine heterogene Population türkisch-afghanisch-kaukasischer Herkunft. Unter den Patienten befinden sich wahrscheinlich kaum deutsche Personen, die nach den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen sehr häufig Mutationsträger sind. Dafür sind darin aber wahrscheinlich umso mehr Patienten türkischer Abstammung, bei denen hier nur eine Allelfrequenz von rund 8% (7,7%) gemessen wird (Tab. 5.3-2 und 4.3-5). Durch die epidemiologische Aufgliederung der untersuchten Studienpopulation können für die türkische Teilpopulation die Ergebnisse von Stoetzel und Mitarbeitern bestätigt werden.

Insgesamt deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass vor allem bei deutschen BBS-Patienten nicht p.Met390Arg in *BBS1* die häufigste Mutation ist, sondern p.Cys91LeufsX5 in *BBS10*. Bei den BBS-Patienten deutscher Herkunft kann im Vergleich zu den Werten der internationalen Literatur eine mehr als doppelt so hohe Allelfrequenz der Mutation p.Cys91LeufsX5 nachgewiesen werden (Tab. 5.3-2 und 4.3-5).

5.3.2 Weitere Mutationen in *BBS1* und *BBS10*

Zusätzlich zu p.Cys91LeufsX5 und p.Met390Arg sind in der Studiengruppe wenige andere Mutationen in *BBS1* und *BBS10* nachweisbar. Mit Ausnahme von p.Arg440X (Exon 13, *BBS1*) und p.Cys377TrpfsX19 (Exon 12, *BBS1*) sind die hier analysierten Mutationen noch nicht in der internationalen Literatur beschrieben (Beales et al. 2003; Mykytyn et al. 2003). Die Signifikanz der Mutationen für das jeweilige Genprodukt kann nicht ermessen werden. Hypothesen über den pathogenen oder neutralen Effekt einer Mutation basieren auf grundlegenden Kenntnissen über biochemische Eigenschaften von Aminosäuren und Polypeptiden sowie einfachen stochastischen Überlegungen zur Auftretenswahrscheinlichkeit.

In *BBS1* lassen sich bei 5,6% (4/72) der Patienten andere Mutationen als p.Met390Arg finden, wobei jede Mutation nur bei einem Individuum auftritt (Tab. 4.3-3 und 4.3-5). Ein deutscher Patient (2089) ist heterozygoter Mutationsträger der Stoppmutation p.Arg440X (Meyer 2008). Sie liegt im Exon 13 und ist bereits in der Literatur als pathogene Sequenzveränderung vorgestellt (Beales et al. 2003). Es handelt sich um eine

Nonsense-Mutation, welche die Genfunktion zerstört. Eine Assoziation mit dem BBS-Phänotyp ist wahrscheinlich.

Ein weiterer deutscher Patient (2095) ist compound-heterozygoter Genträger einer mütterlich ererbten Punktmutation p.Ala447Thr im Exon 13 und einer väterlich ererbten Rasterschubmutation p.Cys377TrpfsX19 im Exon 12 (Abb. 5.3-1). Bei p.Ala447Thr handelt es sich um eine nicht konservative Substitution des unpolaren Alanins durch das polare Threonin mit einer Hydroxygruppe in der Seitenkette (Claus et al. 2007). Diese Missense-Mutation verändert mit großer Wahrscheinlichkeit das BBS1-Protein. Die Rasterschubmutation p.Cys377TrpfsX19 im zweiten Allel hat mit Sicherheit ebenfalls pathogenen Charakter, da sie zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zur langstreckigen Veränderung der Aminosäuresequenz führt (Mykytyn et al. 2003). Diese Proteindefekte stehen sicher in Zusammenhang mit den phänotypischen Merkmalen des BBS bei diesem Patienten.

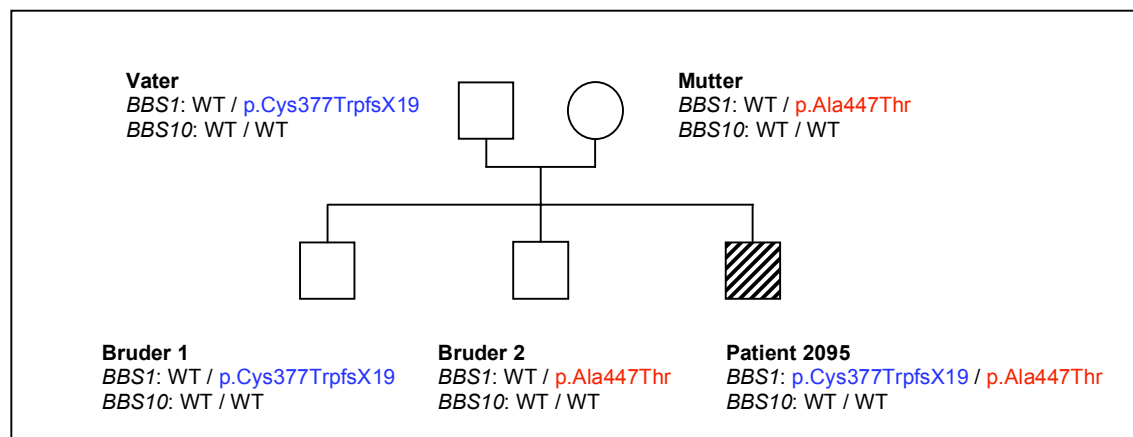


Abbildung 5.3-1: Stammbaum der deutschen Familie 2032 (Patient 2095)

Bei einem türkischen Patienten (2226) zeigt sich der heterozygote Gentstatus mit der Punktmutation p.Ser554Cys in Exon 16 von *BBS1* (Abb.4.1-41) (Claus et al. 2007). Bei der Substitution der Aminosäure Serin durch Cystein wird eine Hydroxyl- durch eine Sulfohydrylgruppe ausgewechselt. Cystein ist die einzige Aminosäure mit einer Sulfohydrylgruppe in der Seitenkette und durch Ausbildung von kovalenten Disulfidbrücken-Bindungen nimmt sie starken Einfluss auf die Proteinstruktur. Das BBS1-Protein kann durch diese Mutation entscheidend verändert werden, was somit Auswirkungen auf den Phänotyp hat. Eine Patientin türkischer Herkunft (2017) ist homozygote Mutationsträgerin einer Deletion von Exon 12 bis 13 in *BBS1* (c.Ex12_Ex13del) (Oeffner et al. 2003). Die Deletion erstreckt sich über mindestens 229bp kodierender Sequenz (Tab. 4.1-5) und es ist zu vermuten, dass sie bereits im Intron 11 beginnt und erst im Intron 13 endet. Die Deletion führt zu einem hypomorphen Allel, wenn nicht sogar zu einem vollständigen Funktionsverlust des *BBS1*-Gens mit schwerwiegenden Auswirkungen auf den Phänotyp.

In *BBS10* ist außer dem hetero- oder homozygoten Genstatus der Mutation p.Cys91LeufsX5 nur eine weitere pathogene Sequenzveränderung in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nachweisbar. Eine deutsche Patientin (2156) ist heterozygote Mutationsträgerin der Rasterschubmutation p.Thr85LysfsX11 (Abb. 4.2-11) (Claus et al. 2007). Im Unterschied zu allen anderen in dieser Studie analysierten Mutationen basiert p.Thr85LysfsX11 auf zwei Veränderungen in der cDNA-Sequenz, einer Baseninsertion und einem Basenaustausch [c.253_254insA, c.254C>G]. Das Auftreten von zwei cDNA-Sequenzvariationen in direkt aufeinander folgenden Basen ist außergewöhnlich und spricht für weit reichende pathogene Folgen. Auf Protein-Ebene kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Kettenabbruch und Proteinverkürzung. Die Mutation ist sicherlich pathogen und hat Auswirkungen auf den BBS-Phänotyp. Bei der betroffenen Patientin 2156 zeigen sich mit Polydaktylie, Retinitis pigmentosa und Adipositas deutliche Merkmale des BBS. Es ist davon auszugehen, dass ein heterozygoter Genotyp allein zur klinischen Manifestation des BBS nicht ausreicht, und daher sind neben p.Thr85LysfsX11 bei ihr noch weitere Mutationen in BBS-Genloci zu erwarten.

Insgesamt finden sich inklusive p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 bei 38,2% (29/76) der Patienten Mutationen (Tab. 4.3-5). Sie gliedern sich auf in 12 heterozygote, einen compound-heterozygoten und 16 homozygote Mutationsträger (Tab. 5.4-3). Unter den deutschen Patienten ist bei 48,1% (26/54) eine Mutation in *BBS1* oder *BBS10* nachzuweisen (Tab. 4.3-5). Zehn deutsche Patienten tragen eine Mutation in *BBS1* (10/54; 18,5%) und 16 deutsche Patienten sind Mutationsträger in *BBS10* (16/54; 29,6%). Die Allelfrequenz für ein mutantes Allel in *BBS1* oder *BBS10* liegt in der deutschen Population bei 38,0% (41/108) (Tab. 4.3-5). Hauptsächlich finden sich bei BBS-Patienten deutscher Herkunft mit einer Allelfrequenz von gemeinsam 34,3% (37/108) die Mutationen p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5, wobei p.Cys91LeufsX5 mit einer Allelfrequenz von 21,3% (23/108) überwiegt (Tab. 4.3-5, 5.3-1 und 5.3-2). Andere Mutationen machen bei deutschen Patienten nur eine Allelfrequenz von 3,7% (4/108) aus (Tab. 4.3-5). Insgesamt ist bei deutschen Patienten deshalb *BBS10* der Genlocus, in dem am häufigsten mutante Allele vorliegen (Tab. 4.3-5).

Unter den 13 türkischen Patienten befinden sich drei Mutationsträger. Die Frequenz für ein mutantes Allel beträgt in der türkischen Population 19,2% (5/26) (Tab. 4.3-5). Die Allelfrequenz für p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 macht nur 7,7% (2/26) aus, während der Anteil anderer Mutationen hier größer ist und 11,5% (3/26) beträgt (Tab. 4.3-5). In der türkischen Population sind daher bei BBS-Patienten vermutlich andere Mutationen vorherrschend als in der nordeuropäischen und nordamerikanischen Bevölkerung. Bei Patienten, die anderer als deutscher oder türkischer Herkunft waren, wurde keine Mutation nachgewiesen (Tab. 4.3-5, 5.3-1 und 5.3-2). Daraus sollten zunächst keine weiteren Rückschlüsse über das Vorkommen von BBS-Mutationen in anderen

Bevölkerungsgruppen gezogen werden, denn eine Patientenanzahl von neun Personen ist zu klein für aussagekräftige Studienergebnisse.

5.4 Der Vererbungsmodus des BBS ist digen oder oligogen

Das BBS wird autosomal rezessiv vererbt, aber nach den wissenschaftlichen Erkenntnissen der letzten Jahre sind Expressivität und Penetranz des BBS-Phänotyps wahrscheinlich durch Mutationen in mehr als einem Genlocus beeinflusst. Es ist daher nicht mehr korrekt, beim BBS ausschließlich von einem autosomal rezessiv vererbten Syndrom zu sprechen, welches den klassischen Mendelschen Regeln entspricht. Molekulargenetische Analysen anderer Forschungsgruppen konnten bei einzelnen BBS-Patienten Mutationen in zwei Genloci nachweisen, wodurch der Begriff des digenen Vererbungsmodus entstanden ist. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass pathogene Mutationen in mehr als zwei Genloci Einfluss auf den Phänotyp nehmen, wird inzwischen beim BBS sogar von einem oligogenen Vererbungsmodus gesprochen (Katsanis 2004).

In dieser Studie können im Rahmen der Mutationssuche in *BBS1* und *BBS10* bei keinem Patienten pathogene Veränderungen in beiden Genen nachgewiesen werden. Vielmehr ist bei vielen klinisch diagnostizierten BBS-Patienten mit deutlich ausgeprägtem Phänotyp bisher nur ein mutantes Allel bei heterozygotem Genotyp eines BBS-Gens festzustellen. Ein Beispiel ist der Patient 2226 aus der türkischen Familie 2078 (Abbildung 5.4-1). In solchen Fällen sind mit Sicherheit weitere Mutationen vorhanden, denn zur klinischen Manifestation des BBS muss mindestens ein Genlocus zwei mutante Allele aufweisen. Es ist also entweder eine zusätzliche Mutation auf dem zweiten Allel des analysierten Genlocus übersehen worden oder es sind zwei mutante Allele in einem anderen BBS-Gen zu erwarten.

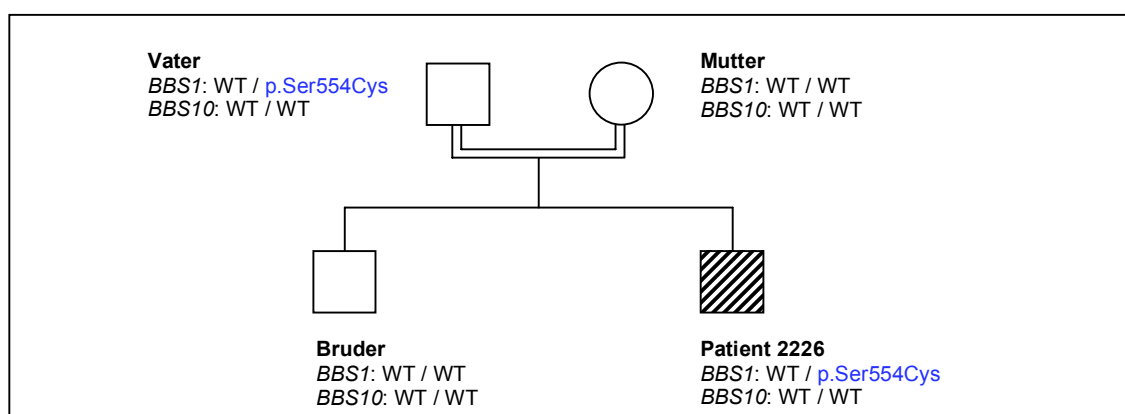


Abbildung 5.4-1: Stammbaum der türkischen Familie 2078 (Patient 2226)

Patient 2226 weist die typischen Merkmale des BBS-Phänotyps auf. Bei ihm konnte aber bisher nur der heterozygote Genstatus eines BBS-Gens (*BBS1*) nachgewiesen werden. Die Eltern des Patienten sind blutsverwandt und Vettern ersten Grades.

Neben den hier erhobenen Analysedaten zu *BBS1* und *BBS10* liegen bei diesem Patientenkollektiv auch Ergebnisse zu molekulargenetischen Analysen in *BBS6* vor (Frick 2007). Unter den 76 Patienten befinden sich sechs Träger von Sequenzveränderungen in *BBS6*, darunter sind jedoch nur zwei Patienten Träger pathogener Mutationen. Sie werden in der Tabelle 5.4-1 aufgelistet, zusätzlich sind darin ihre Sequenzveränderungen in *BBS1* und *BBS10* aufgeführt. Es kann letztendlich auch für *BBS6* in diesem Patientenkollektiv keine Beteiligung an einem oligogenen Vererbungsmodus dokumentiert werden (Tab. 5.4-2). Alle *BBS6*-Mutationsträger tragen in Position c.62_275 der cDNA-Sequenz von *BBS10* den homozygoten Wildtyp und zeigen in der SSCA des Exons 2 von *BBS10* ein unauffälliges Laufverhalten. In *BBS1* weisen sie die stille Mutation c.378G>A(p.=Leu126Leu) und die Intronvariante c.519-75C>T auf, welche aber wahrscheinlich beide keinen pathogenen Charakter haben (Tab. 5.4-1).

Tabelle 5.4-1: Mutationsträger in *BBS6* mit ihren Sequenzvarianten in *BBS1* und *BBS10* Pathogene Mutationen sind fett gedruckt, die übrigen Sequenzveränderungen sind Polymorphismen ohne pathogenen Wert (Frick 2007).

DNA-Nummer der Mutationsträger in <i>BBS6</i>	<i>BBS1</i>	<i>BBS10</i> (c.62_275)
2019 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT	c.378G>A(p.= Leu126Leu)/WT c.519-75C>T/WT c724-8G>C/WT	WT/WT
2023 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT p.Arg517Cys/WT	WT/WT	WT/WT
2065 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT p.Arg517Cys/WT	c.378G>A(p.= Leu126Leu)/WT c.519-75C>T/WT c724-8G>C/WT	WT/WT
2078 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT	WT/WT	WT/WT
2087 p.Tyr37Cys/WT p.Gly532Val/p.Gly532Val c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT	c.378G>A(p.= Leu126Leu)/WT c.519-75C>T/WT	WT/WT
2089 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT p.Arg517Cys/WT	c.378G>A(p.= Leu126Leu)/WT c.519-75C>T/WT c724-8G>C/WT p.Arg440X/WT	WT/WT
2125 p.Tyr37Cys/p.Tyr37Cys p.Gly532Val/p.Gly532Val c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT	c.378G>A(p.= Leu126Leu)/ c.378G>A(p.= Leu126Leu) c.519-75C>T/c.519-75C>T	WT/WT
2183 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT	WT/WT	WT/WT
2189 c.534C>T(p.=Ile178Ile)/WT p.Arg517Cys/WT	WT/WT	WT/WT

Tabelle 5.4-2: Digenes Auftreten von mutanten Allelen in *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* bei 76 Patienten

BBS-Gene mit mutanten Allelen	Patienten
<i>BBS1</i> + <i>BBS10</i>	0/76
<i>BBS1</i> + <i>BBS6</i>	0/76
<i>BBS6</i> + <i>BBS10</i>	0/76

Zusammenfassend finden sich bei der Mutationsanalyse in *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* unter den 76 Patienten der Studiengruppe 31 Mutationsträger. Diese gliedern sich auf in 12 Mutationsträger mit heterozygotem Genstatus, einen Mutationsträger mit compound heterozygotem Genstatus und 18 Mutationsträger mit homozygotem Genstatus (Tab. 5.4-3). Folglich konnten bei 25,0% (19/76) der klinisch diagnostizierten BBS-Patienten zwei mutante Allele in einem Genlocus gefunden werden. Bei ihnen ist die genotypische Bedingung nachgewiesen, welche zur phänotypischen Manifestation eines autosomal rezessiv vererbten Syndroms vorausgesetzt wird.

Tabelle 5.4-3: Aufgliederung der 31 Mutationsträger unter den 76 Patienten nach ihrem Genstatus

Anzahl der Mutations-träger	<i>BBS1</i> -Genotyp	<i>BBS6</i> -Genotyp	<i>BBS10</i> -Genotyp
2	WT/p.Met390Arg	WT/WT	WT/WT
6	p.Met390Arg/p.Met390Arg	WT/WT	WT/WT
1	p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr	WT/WT	WT/WT
1	WT/p.Arg440X	WT/WT	WT/WT
1	WT/p.Ser554Cys	WT/WT	WT/WT
1	c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del	WT/WT	WT/WT
7	WT/WT	WT/WT	WT/p.Cys91LeufsX5
9	WT/WT	WT/WT	p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5
1	WT/WT	WT/WT	WT/p.Thr85LysfsX11
1	WT/WT	p.[Gly532Val/p.Gly532Val]+ p.[WT/ p.Tyr37Cys]	WT/WT
1	WT/WT	p.[Tyr37Cys/ p.Tyr37Cys]+ p.[Gly532Val/p.Gly532Val]	WT/WT

Im Rahmen einer Studie von Mykytyn und Mitarbeitern zeigten sich bei Patienten mit Mutationen in *BBS1* keine zusätzlich mutanten Allele in den Genen *BBS2*, *BBS4* und *BBS6* (Mykytyn et al. 2002; Mykytyn et al. 2003). Im Gegensatz dazu fanden Beales und Mitarbeiter bei einer Analyse von *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* und *BBS7* in 13,3% der Fälle neben Mutationen in *BBS1* auch Mutationen in anderen BBS-Genloci (Beales et al. 2003). Über *BBS10* wird berichtet, dass bei ungefähr 18 % der Mutationsträger mindestens eine zusätzliche Mutation in einem weiteren BBS-Genlocus (*BBS1*, *BBS4*, *BBS6*, *BBS7*) vorzufinden sei (Stoetzel et al. 2006).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann eine Beteiligung der Gene *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* an einem oligogenen Erbgang nicht bestätigt werden. Dieses schließt jedoch oligogen betroffene Mutationsträger in dem analysierten Patientenkollektiv nicht aus, da mutante Allele in anderen Genen als *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* vorhanden sein könnten. Lägen Analysedaten zu weiteren BBS-Genen vor, könnten eventuell Mutationsträger

mit einem digenen oder oligogen Vererbungsmodus entdeckt werden. Wahrscheinlich würde auch die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs die vorliegenden Ergebnisse denen der Literatur annähern.

5.5 Klinische Diskussion

Die Diagnose eines BBS wird klinisch gestellt. Der von Beales und Mitarbeitern vorgeschlagene Kriterienkatalog hat sich dabei sowohl in der Literatur als auch in dieser Studie bewährt (Tab. 5.5-1) (Beales et al. 1999). Bevor ein BBS diagnostiziert wird sollten vier klinische Hauptkriterien oder drei klinische Haupt- und zwei klinische Nebenkriterien vorhanden sein. Ein relativ zuverlässiges Merkmal ist hierbei die postaxiale Polydaktylie. Sie tritt kongenital auf und ist immer ein differenzialdiagnostischer Hinweis auf das BBS. Viele andere Merkmale des Phänotyps manifestieren sich dagegen erst im Jugendalter, sodass meist mehrere Kontrolluntersuchungen notwendig sind, um den Verdacht auf ein BBS zu bestätigen. Trotz der klar definierten phänotypischen Merkmale bleibt die Diagnosestellung des BBS wegen der variablen Expressivität und Penetranz des Phänotyps immer schwierig.

Tabelle 5.5-1: Kriterienkatalog für die klinische Diagnose des BBS (Beales et al. 1999)

Hauptkriterien	Nebenkriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Retinale Dystrophie • Postaxiale Polydaktylie • Adipositas • Mentale Retardierung • Hypogonadismus bei Männern • Renale Anomalie 	<ul style="list-style-type: none"> • Sprachstörung • Strabismus / Linsentrübung / Astigmatismus • Brachydaktylie / Syndaktylie • Entwicklungsverzögerung • Nephrogener Diabetes insipidus • Koordinationsstörung • Spastik (leicht) • Diabetes mellitus • Anomalie der Zähne • Herzfehler • Leberfibrose

Die postaxiale Polydaktylie ist direkt nach der Geburt ohne invasive Untersuchungsmethoden per Blickdiagnose festzustellen. Sie ist in 63-69% der BBS-Fälle ausgebildet (Moore et al. 2005; Beales et al. 1999). Beim Vorliegen einer Polydaktylie sollte das BBS immer als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass ein BBS auch ohne Polydaktylie auftreten kann (Moore et al. 2005; Beales et al. 1999). Es findet sich auch in dieser Studie eine Person, die zwar homozygote Trägerin der Mutation p.Met390Arg ist, jedoch keine Zeichen einer Polydaktylie bietet (Familie 2025; Abb. 5.5-1).

Mindestens jeder zweite BBS-Patient ist adipös. Die Adipositas beginnt sich bereits im Kleinkindalter auszubilden, ist aber meist erst postpubertär als pathologisch einzustufen

(Beales et al. 1999). Sie kann mit dem Body-Maß-Index (BMI) leicht berechnet werden ($\text{BMI} = \text{Masse}(\text{kg})/\text{Größe}(\text{m})^2$; Normbereich = 18,5 bis 24,9 kg/m^2). Die Schwierigkeit liegt darin, zwischen einer syndrombedingten Adipositas und dem nicht-syndromalen multifaktoriell beeinflussten Übergewicht zu differenzieren. Bei jungen Patienten lohnt ein Blick auf die Statur der Eltern und die Frage nach den Essgewohnheiten.

Die Zeichen einer retinalen Dystrophie beziehungsweise einer Retinitis pigmentosa zeigen sich bei nahezu allen erwachsenen BBS-Patienten. Die Symptome reichen von einer Visusreduktion über Nachtblindheit bis hin zum absoluten Verlust der Sehfähigkeit. Bei Kindern mit BBS ist die Retinitis pigmentosa selten oder nur im milden Frühstadium diagnostizierbar. Erste Anzeichen eingeschränkter Sehfähigkeit finden sich bei Acht- bis Neunjährigen und spätestens ab dem 15. Lebensjahr können blinde BBS-Patienten registriert werden (Beales et al. 1999).

Renale Anomalien sind nach den Ergebnissen von Beales und Mitarbeitern bei 24% der BBS-Patienten nachzuweisen und daher häufiger als in der Normalbevölkerung zu beobachten (Beales et al. 1999). Renale Anomalien sind die Hauptursache erhöhter Morbidität und Mortalität beim BBS. Genaue Daten zur ihrer Häufigkeit sind jedoch schwer zu erheben, da nur wenige Patienten im Rahmen der BBS-Diagnostik bildgebende Maßnahmen zur Darstellung der Nieren und des Urogenitaltrakts erhalten (Beales et al. 1999). Bei BBS-Patienten mit durchgeführter Bildgebung, wie zum Beispiel einem Nierenultraschall oder einer Urographie, kann sogar in 46% der Fälle ein pathologischer Befund erhoben werden (Beales et al. 1999; Moore et al. 2005). Es ist aber zu bedenken, dass nur bei Patienten mit einer entsprechenden nephrologischen oder urologischen Indikation eine Bildgebung durchgeführt wird. Pathologische Befunde sind hier sozusagen „vorprogrammiert“ und die phänotypische Relevanz renaler Anomalien könnte überschätzt werden.

Eine Unterfunktion der Keimdrüsen ist oft bei männlichen BBS-Patienten diagnostizierbar. Der Hypogonadismus äußert sich bei Männern mit BBS häufig durch einen Mikropenis und Fertilitätsstörungen, während es bei Frauen vor allem zu Zyklusstörungen und Fehlbildungen des inneren Genitale kommt. Die Diagnose ist bei Männern einfacher zu stellen als bei Frauen. Bei weiblichen BBS-Patienten kann der Hypogonadismus leicht übersehen werden (Beales et al. 1999).

Zeichen mentaler Retardierung werden häufig ab dem Grundschulalter bemerkt, wenn ein direkter Vergleich zu den Mitschülern besteht (Beales et al. 1999). Die Bewertung der mentalen Retardierung als phänotypisches Merkmal des BBS ist kompliziert. Mentale Fähigkeiten sind schwer messbar und außerdem multifaktoriell beeinflusst. Moore und Mitarbeiter behaupten zum Beispiel, dass BBS-Patienten wegen ihrer dysmorphen Mimik irrtümlicherweise als mental retardiert eingeschätzt würden. Tatsächlich läge ihr Intelligenzquotient im Normbereich (Moore et al. 2005).

Zur Dokumentation der phänotypischen Merkmale jedes einzelnen Patienten fand in dieser Studie eine direkte Befragung der Betroffenen und ihrer Familienangehörigen in Form eines von der Arbeitsgruppe speziell hierfür entworfenen Fragebogens statt (Meyer 2008). Weil sich zeigte, dass nur die Polydaktylie, Adipositas und Retinitis pigmentosa sicher erkannt werden können, wurde von der Arbeitsgruppe beschlossen, die übrigen Merkmale nicht mit in die Studie aufzunehmen. Sie könnten fehlerhaft begutachtet worden sein.

Falls keine Befragung der Betroffenen möglich war, blieb nur die Recherche in medizinischen Fremdbefunden. Auch hier werden häufig nur die Merkmale Polydaktylie, Adipositas und Retinitis pigmentosa dargestellt. Die Diagnostik der übrigen Merkmale ist aufwändiger und für den befundenden Arzt nicht immer durchführbar.

Auch wenn zu einzelnen Patienten keine vollständigen klinischen Angaben vorliegen (Tab. 4.2-4), ist davon auszugehen, dass alle Mitglieder des Patientenkollektivs die geforderten klinischen Merkmale des BBS aufweisen (Beales et al. 1999). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund von unsorgfältiger Befunderhebung Patienten in die Studiengruppe aufgenommen wurden, bei denen nicht die klinische Voraussetzung für ein BBS besteht. Fehlerhaft mit einberechnete Patienten führen zu verkleinerten Messwerten für Allelfrequenz und Mutationshäufigkeit. Im Vergleich mit Werten der internationalen Literatur ist die in dieser Studie gemessene Allelfrequenz für Mutationen in *BBS1* tatsächlich um 7,5% niedriger (Tab. 5.1-1) (Beales et al. 2003). Dies könnte unter anderem für falsch diagnostizierte Patienten sprechen, jedoch ist die erhobene Allelfrequenz auch durch die epidemiologische Zusammensetzung der Studiengruppe sowie die Sensitivität der Messmethode beeinflusst.

In klinisch nicht eindeutigen BBS-Fällen kann der positive molekulargenetische Nachweis einer charakteristischen Mutation wie p.Met390Arg oder p.Cys91LeufsX5 zu mehr Klarheit führen. Bei Mutationsträgern mit homozygotem oder compound-heterozygotem Genotyp ist der klinische Verdacht auf ein BBS zu bestätigen, da zwei mutante Allele in einem BBS-Gen erwiesen sind. Bei heterozygoten Mutationsträgern mit nur einem nachweisbaren mutanten Allel handelt es sich nicht immer um BBS-Patienten. Solange ein heterozygoter Mutationsträger klinisch unauffällig bleibt, ist er ein gesunder heterozygoter Genträger. Dagegen handelt es sich bei heterozygoten Mutationsträgern mit phänotypischen klinischen Symptomen trotz des unvollständigen BBS-Genotyps um BBS-Patienten. Bei ihnen wurde entweder eine Mutation im zweiten Allel des analysierten Genlocus übersehen oder es liegen zwei mutante Allele in einem anderen nicht untersuchten Genlocus vor.

Die klinische Variabilität eines BBS lässt sich auch innerhalb von Familien beobachten. Bei der Familienanalyse des 15-jährigen Patienten 2060 (Familie 2025) ergab sich ein bemerkenswerter Befund bei der Untersuchung seiner acht Jahre jüngeren Schwester. Beide Kinder sind homozygote Träger der Mutation p.Met390Arg, aber im Gegensatz zu Patient 2060 (Tab. 4.1-3) hat die Schwester keine Anzeichen einer postaxialen Polydaktylie (Abb. 5.5-1). Sie ist weder adipös noch fehlsichtig und bietet als einziges phänotypisches Merkmal eine psychomotorische Retardierung. Diese Konstellation ist ungewöhnlich, da bisher bei jedem p.Met390Arg-Mutationsträger des Marburger Patientenkollektivs zumindest die Polydaktylie zu beobachten war (Tab. 4.1-3).

Es stellt sich die Frage, ob das Mädchen mit zunehmendem Alter weitere phänotypische Merkmale ausbilden wird. Erste Symptome einer Retinitis pigmentosa könnten sich in den nächsten beiden Lebensjahren zeigen und die Entwicklung eines postpubertären Übergewichts ist ebenfalls möglich. Fänden sich darüber hinaus bei späteren Kontrolluntersuchungen Anomalien des Urogenitaltrakts oder eine primäre Amenorrhoe, bestünden die klassischen klinischen Voraussetzungen zur Diagnose eines BBS. Sie wäre in diesem Falle zu den wenigen BBS-Patienten ohne Polydaktylie zu zählen, wie sie in internationalen klinischen Studien bereits beschrieben wurden (Moore et al. 2005; Beales et al. 1999). Ließe sich jedoch bei ihr weiterhin kein Befund außer der psychomotorischen Retardierung erheben, wäre sie eine untypische homozygote Trägerin der charakteristischen BBS-Mutation p.Met390Arg ohne eine entsprechende klinische Symptomatik.

Ein Stammbaum der deutschen Familie 2025 wird in Abbildung 5.5-1 dargestellt. Die betroffenen Geschwister tragen den homozygoten Genotyp der Mutation p.Met390Arg in *BBS1*. Die Eltern und das dritte Kind sind klinisch gesunde heterozygote Genträger für *BBS1*. In den außerdem analysierten Genen *BBS6* und *BBS10* tragen alle Familienmitglieder den homozygoten Wildtyp.

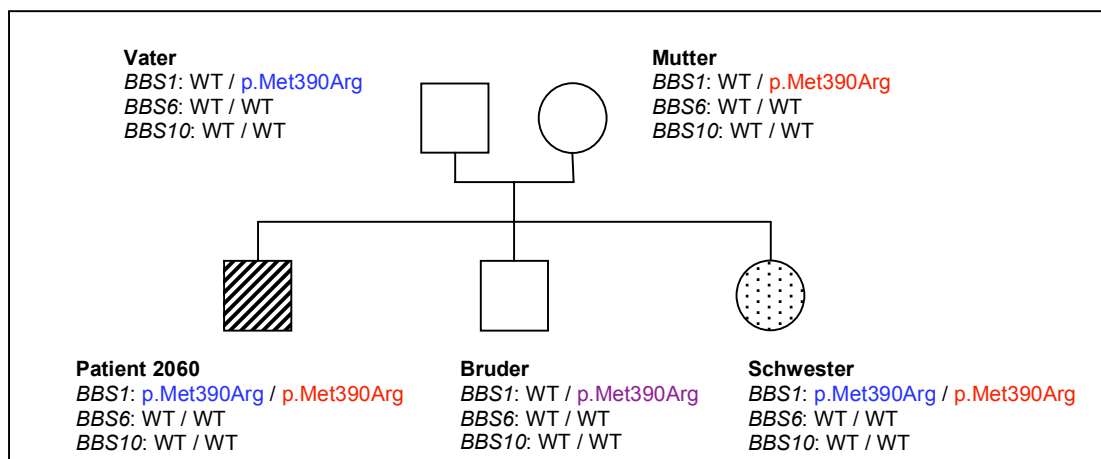


Abbildung 5.5-1: Stammbaum der Familie 2025 (Patient 2060)

Patient 2060 und seine Schwester sind homozygote Mutationsträger von p.Met390Arg, jedoch ist die klinische Symptomatik bei der Schwester sehr viel milder.

Ein vergleichbares Phänomen ist in der Literatur bereits beschrieben worden. Beales und Mitarbeiter konnten bei zwei unverwandten Familien völlig symptomlose homozygote Träger der Mutation p.Met390Arg in *BBS1* entdecken (Abb. 5.5-2) (Beales et al. 2003). In beiden Familien handelt es sich um klinisch gesunde Väter. Die Mütter sind jeweils gesunde heterozygote Genträgerin. Die Kinder der beiden Elternpaare weisen wie ihr Vater den homozygoten Genotyp von *BBS1* mit zwei mutanten p.Met390Arg-Allelen auf. Im Gegensatz zum symptomlosen Vater bieten sie jedoch die klassischen phänotypischen Merkmale des BBS.

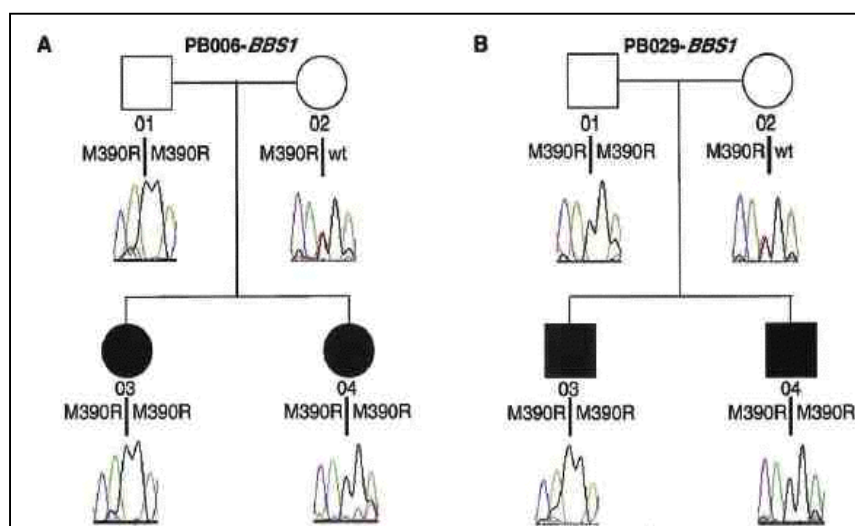


Abbildung 5.5-2: Zwei mutante p.Met390Arg-Allele in *BBS1* führen auch in diesem Fall nicht zur klinischen Manifestation eines BBS (Beales et al. 2003)

Eine dritte Mutation konnte bei keiner dieser Personen nachgewiesen werden, sodass Beales und Mitarbeiter zwei Hypothesen aufstellten:

Hypothese 1: Bei den klinisch betroffenen homozygoten Mutationsträgern ist eine nicht detektierte dritte Mutation vorhanden, die aggravierend wirkt und zur Penetranz des Syndroms führt. Bei den symptomlosen homozygoten Mutationsträgern fehlt diese aggravierende Mutation.

Hypothese 2: Bei den symptomlosen homozygoten Mutationsträgern ist eine nicht detektierte dritte Mutation vorhanden, die protektiv wirkt und die Penetranz des Syndroms verhindert. Bei den klinisch betroffenen homozygoten Mutationsträgern fehlt diese protektive Mutation

Für die zwei Geschwister der Familie 2025 würde dies folgendes bedeuten:

Nach **Hypothese 1** hat Patient 2060 eine zusätzliche Mutation, die bei ihm zur typischen Merkmalsausprägung führt.

Nach **Hypothese 2** hat die Schwester des Patienten eine zusätzliche Mutation, die sie vor der klinischen Symptomatik des BBS schützt.

Es müsste eine Analyse sämtlicher BBS-Gene bei den Geschwistern durchgeführt werden, um Klarheit über eine hypothetische zusätzliche Mutation zu erhalten.

5.6 Die humangenetische Beratung bei BBS-Familien

In der humangenetischen Beratung werden Patienten und betroffene Familienangehörige über das Syndrom und dessen Verlauf ausführlich informiert. Darüber hinaus findet eine sorgfältige Aufklärung über die Möglichkeiten der Diagnostik und Therapie statt (Berufsverband Medizinische Genetik e.V. 1996). Anlass zum Beratungsbedarf geben vor allem Fragen über die Vererbung und Erkrankungsrisiken. Das BBS wird autosomal rezessiv vererbt, wobei seine Merkmalsausprägung sehr wahrscheinlich digen oder auch oligogen bestimmt wird.

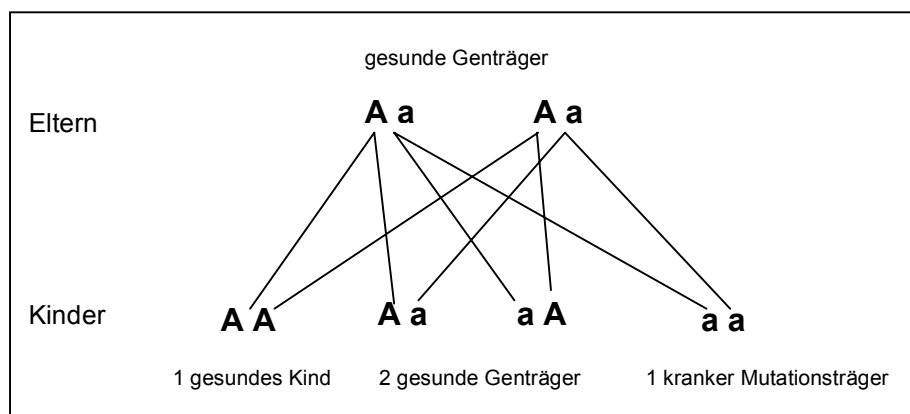


Abbildung 5.6-1: Autosomal rezessiver Erbgang; A = gesundes Allel, a = krankes Allel

Nach den Regeln des autosomal rezessiven Erbgangs müssen BBS-Patienten in mindestens einem BBS-Gen zwei mutante Allele aufweisen. Sie sind homozygote oder compound-heterozygote Mutationsträger. Phänotypisch gesunde Eltern eines an BBS erkrankten Kindes sind demnach heterozygote Genträger in mindestens einem BBS-Genlocus (Abb. 5.6-1). Beispielhaft für einen compound heterozygoten Mutationsträger ist der Patient 2095 aus der Familie 2032, dessen Eltern klinisch gesunde heterozygote Träger verschiedener Mutationen in *BBS1* sind (Abb. 5.3-1). Als homozygoter Mutationsträger ist der Patient 2060 aus der Familie 2025 zu nennen, dessen Eltern beide symptomlose heterozygote Träger der Mutation p.Met390Arg in *BBS1* sind (Abb. 5.5-1).

Beim rein autosomal rezessiven Erbgang liegt die Wahrscheinlichkeit, ein krankes Kind zu bekommen, für gesunde Genträger bei 25% (1/4). Mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% (2/4) wird das Kind selbst gesunder Genträger und mit einer Wahrscheinlichkeit von ebenfalls 25% (1/4) wird es sich um ein gesundes Kind mit homozygotem Wildtyp handeln. Phänotypisch gesunde Geschwister eines BBS-Patienten sind zu 66,6% (2/3) heterozygote Genträger und zu 33,3% (1/3) tragen sie den homozygoten Wildtyp (Abb. 5.6-1).

Nach den aktuellen Hypothesen von Beales und Mitarbeitern muss es sich bei phänotypisch unauffälligen Mitgliedern einer BBS-Familie jedoch nicht immer um heterozygote Genträger oder Träger des Wildtyps handeln (Abb. 5.5-2) (Beales et al. 2003). Sie könnten ebenfalls homozygote Mutationsträger sein, die in einem anderen BBS-Genlocus entweder ein zusätzliches protektiv-mutantes Allel besitzen oder ein aggravierend-mutantes Allel weniger haben als erkrankte Personen. Auch in dieser Studie wird eine homozygote Trägerin der Mutation p.Met390Arg vorgestellt, die eine ungewöhnlich schwache Expression des BBS-Phänotyps ohne Zeichen einer Polydaktylie aufweist (Familie 2025, Abb. 5.5-1).

Das Phänomen symptomloser homozygoter Mutationsträger lässt sich vermutlich auf variable Interaktionsmöglichkeiten mehrerer Genloci zurückführen. Dies ist typisch für einen digenen oder oligogenen Vererbungsmodus. Die Wahrscheinlichkeiten, wie sie beim klassisch autosomal rezessiven Erbgang berechnet sind, werden dadurch fehlerhaft. Die Erkrankungsrisiken werden hier möglicherweise überschätzt. Falls mehr als zwei mutante Allele in mindestens zwei BBS-Genen zur Penetranz des Syndroms beitragen, werden die genotypischen Voraussetzungen zur Manifestation des Phänotyps komplizierter. Di- und oligogene Vererbungsmodi senken daher das Erkrankungsrisiko. Eine Bestätigung dafür findet sich in der Tatsache, dass das BBS ein äußerst seltenes Syndrom ist (Tab. 1.2-1). Wäre der Erbgang rein autosomal rezessiv, gäbe es vielleicht mehr Personen, die vom BBS betroffen sind. Den Ratsuchenden sollten zunächst einmal die Wahrscheinlichkeiten eines autosomal rezessiven Erbgangs genannt werden. Voraussichtlich ist das Risiko aber niedriger einzustufen.

Die Beratungssituation wird zusätzlich dadurch erschwert, dass dem BBS-Phänotyp zugrunde liegende Genotypen nicht immer nachweisbar sind. Die zugehörigen pathogenen Mutationen können in unbekannten BBS-Genloci liegen (Tab. 1.4-1). Mit einer Genotypisierung der häufigen Mutationen p.Met390Arg in *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 in *BBS10* können einigen Ratsuchenden aber mittlerweile genauere Informationen gegeben werden.

Bei deutschen Patienten mit klinisch manifestem BBS-Phänotyp kann nach den Ergebnissen aus dieser Studienpopulation mittels der Genotypisierung von p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 in 42,6% (23/54) der Fälle mindestens ein mutantes Allel festgestellt werden (Tab. 4.3-5). Unter Mitberücksichtigung der ausländischen BBS-Patienten beträgt die Detektionsrate in der gesamten Studienpopulation immer noch 31,6% (24/76). Die klinische Diagnose BBS ist danach molekulargenetisch gesichert, sodass für diese Patienten und ihre Angehörigen Untersuchungen zur weiterführenden Diagnostik beendet sind.

6 Zusammenfassung

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS, OMIM 209900) beruht ätiopathologisch auf einer Dysfunktion ziliärer Strukturen und führt daher zu einer multisystemischen Erkrankung. Der Phänotyp ist durch die Merkmale postaxiale Polydaktylie, Retinitis pigmentosa, Adipositas, Hypogonadismus, renale Anomalien und variable Formen der mentalen Retardierung charakterisiert. Zur klinischen Diagnose des BBS sollten mindestens drei der phänotypischen Merkmale vorhanden sein. Eine Diagnostik anhand laborchemischer Parameter ist bisher nicht möglich. Wahrscheinlich beeinflussen Mutationen in mehr als einem Gen den Phänotyp, sodass beim BBS zusätzlich zum autosomal rezessiven Erbgang auch Hinweise auf digene oder sogar oligogene Vererbungsmodi bestehen. Es sind aktuell 12 BBS-Gene (*BBS1-BBS12*) bekannt. Am häufigsten finden sich bei klinisch diagnostizierten BBS-Patienten die Mutationen p.Met390Arg (c.1169T>G, Exon 12) in *BBS1* und p.Cys91LeufsX5 (c.270_271insT, Exon 2) in *BBS10*. Jedoch sind noch nie gemeinsame Daten zu diesen beiden Mutationen innerhalb eines vorwiegend deutschen Patientenkollektivs erhoben worden. Daher war die Fragestellung dieser Studie, wie viele Individuen in einem Kollektiv von 76 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten (54 Deutsche, 13 Türken, 9 Patienten anderer Herkunft) die Mutationen p.Met390Arg und/oder p.Cys91LeufsX5 aufweisen. Durch den Mutationsnachweis in *BBS1* oder *BBS10* sollte eine molekulargenetische Stützung der oftmals unklaren klinischen Diagnose des BBS erzielt werden, sodass für die Patienten keine weiteren Untersuchungen mehr notwendig sind.

Die Genotypisierung von p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 erbrachte bei 31,6% (24/76) der BBS-Patienten ein Ergebnis. Mit Ausnahme einer türkischen Mutationsträgerin, stammen alle Träger der Mutationen p.Met390Arg (8/54) (Nachweismethode: *AvaII*-Restriktionsverdau) und p.Cys91LeufsX5 (15/54) (Nachweismethode: Direkte Sequenzierung) aus Deutschland. Innerhalb der deutschen Studienpopulation war deshalb bei 42,6% (23/54) der BBS-Patienten die klinische Diagnose durch einen BBS-Genotyp molekulargenetisch zu verifizieren. Aus diesem Grund ist ein Screening von p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 bei deutschen BBS-Patienten sinnvoll. Bei ausländischen Populationen war die Genotypisierung von p.Met390Arg und p.Cys91LeufsX5 nicht so erfolgreich, da diese beiden Mutationen dort nur sehr selten bei BBS-Patienten auftraten (1/22).

Bei der weiteren Mutationssuche in *BBS1* und *BBS10* fanden sich mit Hilfe eines SSCA-Screenings (Einzelstrang-Konformations-Analyse, single-strand conformational analysis, SSCA) noch sechs andere pathogene Mutationen, die jeweils nur bei einem Individuum nachweisbar waren. Jede dieser Einzelmutationen hat pathogenen Wert und trägt sehr wahrscheinlich zur Ausprägung des BBS-Phänotyps bei.

In *BBS1* zeigten sich neben p.Met390Arg die Mutationen p.Arg440X (c.1318C>T, Exon 13), p.Ala447Thr (c.1339G>A, Exon 13), p.S554Cys (c.1660A>T, Exon 16), p.Cys377TrpfsX19 (c.1131_1135delCTTTG, Exon 12) und eine Deletion der Exons 12 bis 13. In *BBS10* ließ sich neben p.Cys91LeufsX5 nur die Einzelmutation p.Thr85LysfsX11 (c.[253_254insA, 254C>G]) nachweisen.

Neben den Daten zu *BBS1* und *BBS10* lagen bei dem getesteten Patientenkollektiv aus einer vorangegangenen Mutationssuche auch Ergebnisse zu *BBS6* vor. Es konnte daher in drei von mindestens zwölf Genloci nach Hinweisen für einen di- oder oligogenen Vererbungsmodus gesucht werden. Es ließen sich aber bei keinem Patienten der Studienpopulation mutante Allele in mehr als einem BBS-Gen feststellen. Dies schließt oligogene Mutationsträger in diesem Patientenkollektiv nicht aus, da sich in anderen als den drei untersuchten BBS-Genen *BBS1*, *BBS6* und *BBS10* trotzdem weitere Mutationen befinden könnten. Zur umfassenden Mutationssuche in weiteren Genorten könnte zum Beispiel ein Microarray-System eingesetzt werden.

7 Abkürzungen und Symbole







7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Acc.No.	Identifikationsnummer der Genbank
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARL6	ADP-ribolysation-factor-like-6
AS	Aminosäure
<i>AvaII</i>	<i>Anabaena variabilis</i> II
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
<i>BBS</i>	BBS-Gen
BBS-Patient	Eine Person, bei der nach klinischen Kriterien das BBS diagnostiziert wurde
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar(e)
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Wurm)
C12orf58	Chaperon des Typs II
DMSO	Dimethylsulfoxid
DM16/DUF1448	In 10 Species konservierte Repeat-Domäne mit regulatorischem X-Box Motiv.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Forward
f.	für
FABB- Proteom	Flagellar apparatus-basal body Proteom
franz.	Französische Sprache
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HGMP	Human Genome Mapping Project Resource
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUGO	Human Genome Project
IFT	Intraflagellarer Transport
kb	Kilobasen
LMBBS	Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom
LMS	Laurence-Moon-Syndrom

M	Molar
MKKS	McKusick-Kaufman-Syndrom
MUT	Mutantes Allel
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
Oligo(s)	Oligonukleotid(e)
OMIM	Online Inheritance in Man (Online-Katalog)
p	franz.: petit, kurzer Arm eines Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PAP	Postaxiale Polydaktylie
PCP	Planar cell polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PilF	Protein domain, involved in twitching mobility and type-IV pilus assembly
PTHb1	B1 ist kodierendes Gen f. Parathormon (PTH)
q	franz. : queue, langer Arm eines Chromosoms
R	Reverse
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SE	Disodium-EDTA und Natriumchlorid
SSCA	Single-strand conformational analysis
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	Polymerase isoliert aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCP	T-complex-related-proteins
TCP1-Chaperon	Chaperon des Typs II
TE	Tris-EDTA
TEMED p.a.	Tetramethylethyldiamid gelöst
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
TPR	Tetratricopeptid repeats
TRIM32	Tripartit motif protein 32
TTC8	Tetratricopeptid repeat protein 8
U	Units
UCSC	University of California Santa Cruz
WT	Wildtyp-Allel
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent

7.2 Symbole

7.2.1 Stammbaumsymbole

	männliche Person, nicht betroffen		männliche Person, am BBS erkrankt		männliche Person mit schwachem BBS-Phänotyp
	weibliche Person, nicht betroffen		weibliche Person, am BBS erkrankt		weibliche Person mit schwachem BBS-Phänotyp

7.2.2 Symbole zur Beschreibung des Genotyps

WT/WT	homozygoter Träger / homozygote Trägerin des Wildtyps
WT/MUT	heterozygoter Träger / heterozygote Trägerin einer Mutation
MUT/MUT	homozygoter Träger / homozygote Trägerin einer Mutation

8 Literaturverzeichnis

- Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628-633
- Badano JL, Ansley SJ, Leitch CC, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003a) Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am J Hum Genet* 72:650-658
- Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, Castellan C, Beales PL, Leroux MR, Katsanis N (2003b) Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet* 12:1651-1659
- Bardet G (1920) Sur un syndrome d'obésité congénital avec polydactylie et rétinite pigmentaire (contribution à l'étude des formes cliniques de l'obésité hypophysaire). Université de Paris, Paris
- Beales PL (2005) Lifting the lid on Pandora's box: the Bardet-Biedl syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 15:315-323
- Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1187-1199
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36:437-446
- Berufsverband Medizinische Genetik e.V. DGfH (1996) Leitlinien zur Erbringung humangenetischer Leistungen; 1. Leitlinien zur Genetischen Beratung. *medgen* 8 Heft 3:Sonderbeilage 1-2
- Biedl A (1922) Ein Geschwisterpaar mit adiposo-genitaler Dystrophie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 48:1633
- Blacque OE, Reardon MJ, Li C, McCarthy J, Mahjoub MR, Ansley SJ, Badano JL, Mah AK, Beales PL, Davidson WS, Johnsen RC, Audeh M, Plasterk RH, Baillie DL, Katsanis N, Quarmby LM, Wicks SR, Leroux MR (2004) Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev* 18:1630-1642
- Bruhl P, Schwanitz G, Mallmann R, Muller SC, Raff R (2001) [Bardet-Biedl syndrome: aspects of nephro-urology and human genetics]. *Klin Padiatr* 213:8-12
- Burghes AH, Vaessin HE, de La Chapelle A (2001) Genetics. The land between Mendelian and multifactorial inheritance. *Science* 293:2213-2214

- Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE, Nishimura DY, Braun TA, Kim KY, Huang J, Elbedour K, Carmi R, Slusarski DC, Casavant TL, Stone EM, Sheffield VC (2006) Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6287-6292
- Chiang AP, Nishimura D, Searby C, Elbedour K, Carmi R, Ferguson AL, Secrist J, Braun T, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2004) Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). *Am J Hum Genet* 75:475-484
- Claus H, Frick B, Meyer J, Panzner G, Oeffner F, Koch MC (2007) *BBS1* and *BBS10* molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome. *Medizinische Genetik* 19:64
- David A, Bitoun P, Lacombe D, Lambert JC, Nivelon A, Vigneron J, Verloes A (1999) Hydrometrocolpos and polydactyly: a common neonatal presentation of Bardet-Biedl and McKusick-Kaufman syndromes. *J Med Genet* 36:599-603
- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12
- Eley L, Yates LM, Goodship JA (2005) Cilia and disease. *Curr Opin Genet Dev* 15:308-314
- Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R (2003) Waldeyer, Anatomie des Menschen, 17. Auflage.
- Farag TI, Teebi AS (1989) High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin Genet* 36:463-464
- Frick B (2007) Zur Frage der Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS), Molekulargenetische Analysen in den Genen *BBS1* und *BBS6*. Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg
- Green JS, Parfrey PS, Harnett JD, Farid NR, Cramer BC, Johnson G, Heath O, McManamon PJ, O'Leary E, Pryse-Phillips W (1989) The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321:1002-1009
- Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, Sirot Y, Clech L, Ozilou C, Auge J, et al. (2005) Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 76:493-504
- Katsanis N (2004) The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R65-71
- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR (2001a) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256-2259

- Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67-70
- Katsanis N, Lupski JR, Beales PL (2001b) Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 10:2293-2299
- Kaufman RL, Hartmann AF, McAlister WH (1972) Family studies in congenital heart disease, II: A syndrome of hydrometrocolpos, postaxial polydactyly and congenital heart disease. *Birth Defects Orig Artic Ser VIII*(5):85-86
- Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Venner K, Ansley SJ, Ross AJ, Leroux MR, Katsanis N, Beales PL (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462-470
- Kim JC, Ou YY, Badano JL, Esmail MA, Leitch CC, Friedrich E, Beales PL, Archibald JM, Katsanis N, Rattner JB, Leroux MR (2005) MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J Cell Sci* 118:1007-1020
- Laurence J, Moon R (1866) Four cases of "retinitis pigmentosa" occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. *Opthalmol Rev* 2:32-41
- Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Leroux MR, Davidson WS, Beales PL, Guay-Woodford LM, Yoder BK, Stormo GD, Katsanis N, Dutcher SK (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117:541-552
- McKusick VA, Bauer RL, Koop CE, Scott RB (1964) Hydrometrocolpos as a Simply Inherited Malformation. *Jama* 189:813-816
- Meyer J (2008) Das klinische Bild und die Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms, Molekulargenetische Analysen im *BBS1*-Gen. Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg (in Vorbereitung)
- Moore SJ, Green JS, Fan Y, Bhogal AK, Dicks E, Fernandez BA, Stefanelli M, Murphy C, Cramer BC, Dean JC, Beales PL, Katsanis N, Bassett AS, Davidson WS, Parfrey PS (2005) Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *Am J Med Genet A* 132:352-360
- Myktytn K, Nishimura DY, Searby CC, Beck G, Bugge K, Haines HL, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Iannaccone A, Jacobson SG, Weleber RG, Wright AF, Riise R, Hennekam RC, Luleci G, Berker-Karauzum S, Biesecker LG, Stone EM, Sheffield VC (2003) Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (BBS1). *Am J Hum Genet* 72:429-437

- Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen HJ, Beck JS, Braun T, Streb LM, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Luleci G, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Jacobson SG, Heckenlively JR, Weleber RG, Stone EM, Sheffield VC (2002) Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31:435-438
- Nishimura DY, Swiderski RE, Searby CC, Berg EM, Ferguson AL, Hennekam R, Merin S, Weleber RG, Biesecker LG, Stone EM, Sheffield VC (2005) Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *Am J Hum Genet* 77:1021-1033
- Oeffner F, Lerche D, Hoffmeister H, Bornholt D, Kersten J, Abdel-Aleem A, Rubeck A, Neundorff A, Moch C, Grzeschik K-H, Koch MC (2003) Mutation analysis in Bardet-Biedl syndrome. *Medizinische Genetik* 15:325
- Ou G, Blacque OE, Snow JJ, Leroux MR, Scholey JM (2005) Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* 436:583-587
- Pazour GJ, Witman GB (2003) The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol* 15:105-110
- Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135-1140
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265:687-695
- Schachat AP, Maumenee IH (1982) Bardet-Biedl syndrome and related disorders. *Arch Ophthalmol* 100:285-288
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332
- Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, Leitch CC, et al. (2006) BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38:521-524
- Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghoul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P, Hamel C, de Ravel TJ, Lewis RA, Friederich E, Thibault C, Danse JM, Verloes A, Bonneau D, Katsanis N, Poch O, Mandel JL, Dollfus H (2007) Identification of a Novel BBS Gene (BBS12) Highlights the Major Role of a Vertebrate-Specific Branch of Chaperonin-Related Proteins in Bardet-Biedl Syndrome. *Am J Hum Genet* 80:1-11
- Teebi AS (1994) Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. *J Med Genet* 31:224-233

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

9.1.1 Philipps-Universität Marburg

Arnold	Griss	Lang	Röhm
Aumüller	Grundmann	Lenz	Röper
	Grzeschik	Lill	Rosenow
Basler	Gudermann	Löffler	Rothmund
Baum		Lohoff	
Becker	Hamer		Schäfer
Bertalanffy	Hasilik	Maier	Schäfer
Bien	Hertl	Maisch	Schmidt
Boudriot	Herrmann-Lingen	Mandrek	Schnabel
	Hofmann	Moll	Schneider
Cetin	Hoyer	Moosdorf	Schrader
Christiansen		Mueller	Seitz
Czubayko	Jungclas	Müller	Sommer
		Mutters	Steininger
Daut	Kalder		Strauch
	Kill	Neubauer	Sure
Eilers	Klenk		
	Klose	Oertel	Vogelmeier
Feuser	Koch		
Folz	Köhler	Radsak	Wagner
Fuchs	Koolmann	Remschmidt	Weihe
	Krause	Renz	Weiler
Gerdes	Krieg	Richter	Werner
Göke	Kroll	Riera	Westermann
Görg	Kuhlmann		Wollenberg
Gotzen			Wulf

9.1.2 Justus-Liebig-Universität Gießen

Schneider

Weiler

9.1.3 Université de Poitiers

Dighiero	Hankard
Doré	
	Magnin
Fontanel	
	Ouaki
Gayet	
Guillet	Wierzbicka

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Helene Luise Claus
Anschrift	Adamstraße 20, 50996 Köln
Geburtsdatum	21. Dezember 1981
Geburtsort	Ulm

Ausbildung

Schule	1987	Mill-Hill-Junior-School, London (England)
	1988-1992	Grundschule Baiersdorf
	1992-1996	Emil-von-Behring Gymnasium Erlangen
	1996-1998	Edith-Stein-Schule Darmstadt
	1998-1999	Oundle-School, Oundle (England)
	1999-2001	Edith-Stein-Schule Darmstadt
		Abschluss: Abitur
Universität	2001-2004	Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg
	2004-2005	Studium der Medizin an der Université de Poitiers (Frankreich)
	2005-2008	Studium der Medizin an der Philipps-Universität in Marburg
	09/2005–02/2007	Promotionsarbeit am Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Manuela C. Koch
	02/2007-01/2008	Praktisches Jahr
	02/2007-06/2007	Innere Med.(Universitätsklinikum Marburg)
	06/2007-09/2007	Chirurgie (Kreiskrankenhaus Frankenberg)
	10/2007-01/2008	Neurologie (Inselspital Bern)
	Frühjahr 2008	Staatsexamen Humanmedizin (2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung)
	ab Sommer 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität zu Köln

Köln, im Frühjahr 2008

9.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. K.-H. Grzeschik danke ich für die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit am Zentrum für Humangenetik in Marburg durchführen durfte.

Frau Professor Dr. Manuela C. Koch möchte ich für die intensive und sehr gute Betreuung während der gesamten Arbeit danken. Ihre unermüdliche Hilfe hat entscheidend zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen.

Frau Gerti Panzner danke ich für ihre Geduld bei meiner Einarbeitung im Labor und die freundschaftliche Unterstützung, ohne die mir diese Arbeit sehr viel schwerer gefallen wäre.

Herrn Benjamin Frick danke ich für die Einarbeitung in die Methoden und die wertvollen Ratschläge.

Frau Dorothea Bornholdt danke ich für die nützlichen Tipps zur SSCA-Durchführung.

Herrn Philipp Steffen möchte ich für die Hilfestellung bei der Internet-Recherche und der Handhabung der Software zur Sequenzauswertung danken.

Herrn Dr. Frank Oeffner danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der Sequenzanalysen.

Ich danke allen Patientinnen und Patienten für die Teilnahme an dieser Studie und Frau Franziska Kellermann von der Laienorganisation Pro Retina Deutschland e.V. bzw. deren Untergruppe „BBS“ für ihre Kooperation.

Allen zuweisenden Ärzten danke ich für ihre Unterstützung.

Frau Julia Schiller möchte ich für all die aufbauenden Worte in dieser Zeit danken.

Ich danke meinem lieben Freund Daniel für die Geduld mit mir.

Insbesondere danke ich meinen Eltern.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„ Mutationsanalysen in *BBS1* und *BBS10* bei Patienten mit dem Bardet-Biedl-Syndrom“

im Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Professor Dr. med. Manuela C. Koch und mit Unterstützung durch Frau Gerda Panzner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Claus H., Frick B., Meyer J., Panzner G., Oeffner F., Koch M.C. (2007) *BBS1* and *BBS10* molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome. Medizinische Genetik 19:64; Poster bei der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Bonn 7.-10. März 2007 (Abb. 9.5-1)

Ort:

Datum:

Unterschrift:

Helene Luise Claus

9.5 Poster



BBS1 and BBS10 molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome

Claus H., Frick B., Meyer J., Panzner G., Oeffner F., Koch M.C.

Zentrum für Humangenetik, Philipps-Universität Marburg, Germany

Contact: helene.claus@gmx.de; koch2@staff.uni-marburg.de



Introduction:

The autosomal recessively inherited Bardet-Biedl syndrome (BBS, OMIM 209900) is a disorder affecting primary cilia and microtubule-based structures arising from the basal body. These cell structures are involved as mechanosensors in kidney epithelium, photoreceptor cells of the retina and in the developmental phenomenon of planar cell polarity (Fig. 1). The syndrome is phenotypically characterized by postaxial polydactyly, retinopathy, obesity, hypogonadism in males, renal dysfunction and variable mental deficiency (Table 1).

Over the past years it has become obvious that BBS is genetically heterogeneous with several genes (*BBS1*-*BBS12*) involved (Table 2). Molecular analyses have shown that some individuals need mutations in more than one *BBS* locus for clinical manifestation. Therefore BBS is currently regarded as a disorder with digenic or even oligogenic inheritance.

Most mutations are private mutations in the respective individual and his family. Until now only two mutations occur more frequently and are present in different populations. In the European population the *BBS1* mutation p.Met390Arg is observed in about 18% of individuals with BBS, whereas it is infrequent in the Turkish population. A second major locus is *BBS10* in which the mutation p.Cys91LeufsX5 was found in 13% of individuals in different ethnicities.

Table 1: Diagnostic criteria for BBS according to Beales et al. 1999

Primary features	Secondary features
<ul style="list-style-type: none"> • Cone-rod dystrophy • Postaxial polydactyly • Truncal Obesity • Mental deficiency • Hypogonadism in males • Renal dysfunction 	<ul style="list-style-type: none"> • Speech disorder • Strabismus / cataracts / astigmatism • Brachydactyly / syndactyly • Developmental delay • Nephrogenic diabetes insipidus • Ataxia / poor coordination • Mild hypertension • Diabetes mellitus • Dental crowding • Cardiovascular anomalies • Hepatic involvement

Results and Conclusion:

We screened a sample of 80 BBS patients for the *BBS1* mutation p.Met390Arg (c.1169T>G) and for the *BBS10* mutation p.Cys91LeufsX5 (c.270_271insT). The mutation p.Met390Arg was found in 14% of German but not in any Turkish patients. In addition, we detected in *BBS1* five unique mutations in different families: a 50bp insertion in exon 12 (p.Cys377TrpfsX19), a deletion of exons 12+13 (c.Ex12_Ex13del), and three point mutations (c.1318C>T, p.Arg440X; c.1339G>A, p.Ala447Thr; c.1660A>T, p.Ser554Cys). In *BBS6* only two point mutations were found (Table 4). The mutation p.Cys91LeufsX5 was found in 29% of German and in 8% of Turkish patients. Additionally we observed in *BBS10* a combined 1 bp insertion and point mutation: c.(253_254insA, 254C>G), p.Trp85LysfsX11. In summary, the mutations p.Met390Arg and p.Cys91LeufsX5 were detected in 43% of German patients (Table 3). Therefore, this limited and low cost molecular test is helpful to support the clinical diagnosis of BBS in our population. The variant p.Cys91LeufsX5 is the most prevalent mutation in German BBS patients and outnumbers p.Met390Arg threefold. Table 4 summarizes the results of the detected mutations in *BBS1*, *BBS6* and *BBS10*. There cannot be found any prove for these loci to be involved in digenic or oligogenic inheritance.

Table 3: Frequency of mutations in *BBS1*, *BBS6* and *BBS10* in the study group

	Germany		Turkey		others		all	
	patients	alleles	patients	alleles	patients	alleles	patients	alleles
WT/p.Met390Arg	2/56	2/112	0/12	0/24	0/9	0/18	2/77	2/154
	3,57%	1,79%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	2,60%	1,30%
p.Met390Arg/p.Met390Arg	6/56	12/112	0/12	0/24	0/9	0/18	6/77	12/154
	10,71%	10,71%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	7,72%	7,72%
Carriers of p.Met390Arg	8/56	14/112	0/12	0/24	0/9	0/18	8/77	14/154
	14,29%	12,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	10,39%	9,09%
WT/p.Cys91LeufsX5	7/56	7/112	0/13	0/26	0/9	0/18	7/78	7/156
	12,50%	6,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	8,97%	4,49%
p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5	6/56	18/112	1/13	2/26	0/9	0/18	10/78	18/156
	16,07%	16,07%	7,69%	7,69%	0,00%	0,00%	12,82%	11,54%
Carriers of p.Cys91LeufsX5	16/56	26/112	1/13	2/26	0/9	0/18	17/78	27/156
	28,57%	23,32%	7,69%	7,69%	0,00%	0,00%	21,79%	17,31%
Carriers of p.Met390Arg or p.Cys91LeufsX5	24/56	39/112	1/13	2/26	0/9	0/18	25/78	41/156
	42,86%	34,82%	7,69%	7,69%	0,00%	0,00%	32,05%	26,28%
other mutations in <i>BBS1</i>	2/56	3/106	2/13	3/26	0/9	0/18	4/72	6/144
	3,77%	2,83%	15,38%	11,54%	0,00%	0,00%	5,56%	4,17%
Mutations in <i>BBS6</i>	2/54	4/108	0/10	0/20	0/9	0/18	2/62	4/122
	3,70%	3,70%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,23%	3,28%
other mutations in <i>BBS10</i>	1/54	1/108	0/13	0/26	0/9	0/18	1/78	1/152
	1,85%	0,93%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,32%	0,66%
Carriers of mutations in <i>BBS1</i> , <i>BBS6</i> or <i>BBS10</i>	29/56	47/112	3/13	5/26	0/9	0/18	32/78	52/156
	51,79%	41,96%	23,08%	19,23%	0,00%	0,00%	41,03%	33,33%

Table 4: Mutations detected in 32 BBS-patients

patients	<i>BBS1</i> -Genotype	<i>BBS6</i> -Genotype	<i>BBS10</i> -Genotype
2	WT/p.Met390Arg	WT/WT	WT/WT
7	p.Met390Arg/p.Met390Arg	WT/WT	WT/WT
1	p.Cys377TrpfsX19/p.Ala447Thr	WT/WT	WT/WT
1	WT/p.Arg440X	WT/WT	WT/WT
1	WT/p.Ser554Cys	WT/WT	WT/WT
1	c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del	WT/WT	WT/WT
7	WT/WT	WT/WT	WT/p.Cys91LeufsX5
9	WT/WT	WT/WT	p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5
1	WT/WT	WT/WT	WT/p.Trp85LysfsX11
1	WT/WT	p.[Gly532Val;p.Gly532Val]p.[Trp85LysfsX11]	WT/WT
1	WT/WT	p.[Trp85LysfsX11]	WT/WT

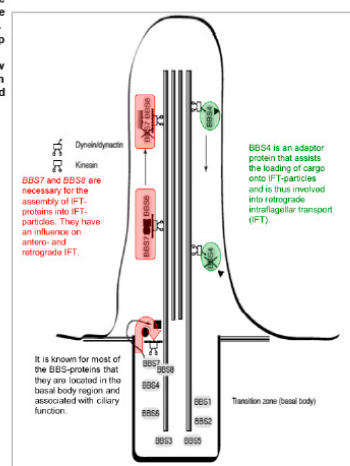
Acknowledgments:

We thank the patients and the organisation PRO RETINA for their constant support and participation in the study. We also thank the referring clinicians for supplying clinical data.

Table 2: *BBS*-genes and their putative proteins

Gene	Recognized domains	Cellular localisation	Putative function
<i>BBS1</i>	(Six-bladed β -propeller-region)	Basal body/cilium	Cilia function
<i>BBS2</i>	(Six-bladed β -propeller-region)	Basal body/cilium	Cilia function, flagellum formation
<i>BBS3/ARL6</i>	GTP-binding	Basal body/cilium	Vesicle trafficking
<i>BBS4</i>	TPRP/PIF	Pericentriolar/basal body	Adapter protein for IFT and cilia function
<i>BBS5</i>	DM16/DUF1448	Basal body/cilium	Cilia function, flagellum formation
<i>BBS6/MKS</i>	TCF1-chaperonin	Pericentriolar/basal body	Microtubule-dependent membrane trafficking
<i>BBS7</i>	TPRP/PIF (Six-bladed β -propeller-region)	Basal body/cilium	IFT particle assembly
<i>BBS8/TTCH</i>	TPRP/PIF	Pericentriolar region	IFT particle assembly
<i>BBS9/B1</i>	PT1H1	Cilium	unknown
<i>BBS10</i>	C12orf58, chaperonin	Pericentriolar/basal body	unknown
<i>BBS11/TRIM32</i>	E3 ubiquitin ligase	Interacts with <i>BBS1</i> and <i>BBS9</i>	unknown
<i>BBS12</i>	Type II chaperonin	unknown	Interaction with <i>BBS6</i> and <i>BBS10</i>

Figure 1: Schematic representation of the putative localization of BBS-proteins according to Beales et al. 2005



Methods:

BBS1:

Reference Sequence: accession number NM_024649.4

Mutational analysis:

p.Met390Arg: *Ava*I-restriction enzyme digestion of amplified PCR-product (exon 12) further mutational analysis: SSCA of exons 4, 5, 7-10, 12, 13, 15 and 16 (12% polyacrylamide gel at 10° C and 12° C) and sequencing of aberrant SSCA-fragments

BBS6: Reference Sequence: accession number AF_221993.1

Mutational analysis: SSCA of exons 3-6 (12% polyacrylamide gel at 10° C and 12° C) and sequencing of aberrant SSCA-fragments

BBS10: Reference Sequence: accession number NM_024685.2

Mutational analysis for p.Cys91LeufsX5 and other mutations: direct sequencing of exon 2

- References
- Beales et al. (1999) J Med Genet 36:437-446
 - Beales (2005) Curr Opin Genet & Develop 15:315-323
 - Chiang et al. (2006) PNAS 103:6287-6292
 - Kabani (2004) Hum Mole Genet 13:R65-R71
 - Nishimura et al. (2005) Am J Hum Genet 77:1021-1033
 - Stoetzel et al. (2006) Nature Genet 38:521-1033
 - Stoetzel et al. (2007) Am J Hum Genet 80:1-11

Abbildung 9.5-1: Dieses Poster veröffentlichte bei der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik am 7.-10. März 2007 in Bonn Inhalte der Dissertation (Claus et al. 2007).

